



Université de Montréal

**Identification des composantes du système ubiquitine-protéasome régulant la stabilité de  
la MAPK atypique ERK3.**

par Simon Mathien

Département de biologie moléculaire  
Faculté de médecine

Thèse présentée  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor  
en Biologie moléculaire  
option biologie des systèmes

Décembre, 2016

© Simon Mathien, 2016

## Résumé

La kinase ERK3 est un membre atypique de la famille des MAP Kinases. Contrairement aux MAP Kinases conventionnelles qui peuvent phosphoryler une grande variété de substrats, et dont les fonctions sont bien définies, les déterminants moléculaires des fonctions de ERK3 restent peu caractérisés.

Les études de la régulation de ERK3 font ressortir plusieurs particularités qui sont uniques au sein de la famille des MAP Kinases. ERK3 semblent être phosphorylée de manière constitutive sur sa boucle d'activation. De plus, ERK3 est une protéine hautement instable, qui est dégradée constitutivement par le système ubiquitine-protéasome. Cette régulation de la stabilité de ERK3 est un processus dynamique, car il peut être modulé par certains stimuli physiologiques. Il semble donc que la stabilité de la protéine ERK3 est un des régulateurs majeurs de son activité biologique. Toutefois, les composantes du système ubiquitine-protéasome qui contrôlent la stabilité de ERK3 restent à identifier.

La première étude présentée décrit l'identification de la déubiquitinase USP20 comme un régulateur positif de la stabilité et de l'expression protéique de ERK3. Nos résultats indiquent que USP20 est une déubiquitinase de ERK3, en démontrant la relation enzymatique directe entre les deux protéines. Finalement, nous avons identifié une nouvelle fonction pour ERK3 dans le contrôle de la migration cellulaire et déterminé que USP20 est un régulateur positif de cette fonction cellulaire.

Dans la deuxième étude nous décrivons la réalisation d'un crible fonctionnel pour identifier les ubiquitines ligases et conjugases qui régulent la dégradation de ERK3. Nos résultats décrivent la mise au point d'un système rapporteur de la stabilité protéique, utilisable dans les études automatisées à haut débit. Parmi les régulateurs identifiés, nos efforts se sont concentré sur l'ubiquitine ligase E6AP, dont nous avons démontré la fonction régulatrice de la stabilité et de l'expression protéique de ERK3. Finalement nous avons démontré que E6AP contrôle l'ubiquitination de ERK3.

En conclusion, nos travaux ont permis d'identifier certains régulateurs de la stabilité de ERK3 et d'en caractériser des nouvelles fonctions. De plus, nos études fournissent des pistes

d'études pour mieux comprendre les fonctions biologiques de ERK3, qui restent à l'heure actuelle encore peu définies.

**Mots-clés** : MAP Kinase, ERK3, ubiquitination, stabilité, migration cellulaire, ubiquitine ligase, déubiquitinase, signalisation cellulaire

## **Abstract**

ERK3 kinase is an atypical member of the MAP Kinase family. Conventional MAP Kinases phosphorylate a wide array of substrates and have well characterized functions whereas ERK3 biological activity is still poorly described.

ERK3 regulations are unique among MAP Kinase family. Indeed, ERK3 seems constitutively phosphorylated on its activation loop. Moreover, ERK3 is a highly unstable protein, constitutively degraded by the ubiquitin-proteasome system. These observations suggest that ERK3 stability is a key regulator of its biological activity. Nonetheless, components of the ubiquitin-proteasome machinery regulating ERK3 turnover remain to be identified.

The first part of my work identifies and characterizes USP20 deubiquitinase as a positive regulator of ERK3 protein expression and stability. By means of a direct enzymatic activity experiment, our results indicate that UPS20 is a bona fide deubiquitinase of ERK3. Finally, we identified a novel function of ERK3 in the control of cell migration and we determined the involvement of USP20 as an upregulator of this cellular function.

The second part of my research illustrates the product of a functional screen that identifies ubiquitin ligases and conjugases regulating ERK3 degradation. Our results discuss the development of a reporter system of protein turnover, suitable for high-throughput experiments. Among the identified regulators, we focused on E6AP ubiquitin ligase, for which we showed a function in the regulation of ERK3 protein abundance and turnover. Ultimately, we demonstrated the E6AP controls ERK3 ubiquitination.

In conclusion, our work permits the identification of regulators of ERK3 protein stability and characterization of new cellular functions. Moreover, this study provides innovative avenues to better understand the biological activity of ERK atypical MAP Kinase.

**Keywords** : MAP Kinase, ERK3, ubiquitination, protein stability, cell migration, ubiquitin ligase, deubiquitinase, cell signaling

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xix
Chapitre I : Introduction.....	21
1.1 Les MAP Kinases .....	21
1.1.1 Les MAP Kinases conventionnelles .....	22
1.1.1.1 ERK1/2 .....	22
Identification et structure .....	23
Substrats et fonctions .....	24
1.1.1.2 JNK et p38 .....	27
Identification et structure .....	27
Substrats et fonctions .....	28
1.1.1.3 ERK5.....	29
Identification et structure .....	29
Substrats et fonctions .....	30
1.1.2 Les MAP Kinases atypiques .....	30
1.1.2.1 NLK .....	31
Identification et structure .....	31
Substrats et fonctions .....	31
1.1.2.2 ERK7 (ERK8).....	33
Identification et structure .....	33
Substrats et fonctions .....	33
1.1.2.3 ERK3 et ERK4.....	34
Identification et structure .....	34
Substrats.....	36

Fonctions cellulaires .....	38
1.1.3 Régulation de l'activité des MAP Kinases .....	47
1.1.3.1 Contrôle de l'expression des MAP Kinases.....	47
1.1.3.1.1 MAP Kinases conventionnelles .....	47
1.1.3.1.2 MAP Kinases atypiques : NLK et ERK7.....	49
1.1.3.1.3 ERK3 et ERK4.....	49
1.1.3.2 Phosphorylation de la boucle d'activation.....	51
1.1.3.2.1 ERK1/2 .....	51
1.1.3.2.2 JNK et p38 .....	53
1.1.3.2.3 ERK5.....	54
1.1.3.2.4 NLK .....	55
1.1.3.2.5 ERK7 (ERK8).....	55
1.1.3.2.6 ERK3 et ERK4.....	57
1.1.3.3 Contrôle négatif de la phosphorylation des MAP Kinases par les phosphatases .....	57
1.1.3.4 Contrôle de la localisation cellulaire.....	60
1.1.3.5 Régulation de l'activité de MAP Kinases : conclusions.....	61
1.2 Le système ubiquitine-protéasome .....	62
1.2.1 Un système de maintien de l'homéostasie protéique à deux composantes.....	62
1.2.2 L'histoire du système ubiquitine protéasome .....	63
1.2.3 Le protéasome.....	64
1.2.3.1 Structure et activité .....	65
1.2.3.2 20S protéasome.....	66
1.2.3.3 19S protéasome.....	67
1.2.4 La machinerie d'ubiquitination.....	68
1.2.4.1 L'ubiquitination : une modification pour des messages distincts de signalisation cellulaire.....	69
1.2.4.2 Différentes types d'ubiquitination .....	70
1.2.4.3 Un cas atypique d'ubiquitination : l'ubiquitination N-terminale.....	73
1.2.4.5 L'enzyme d'activation E1 .....	75
1.2.4.6 Les conjuguases de l'ubiquitine E2 .....	76

1.2.4.7 Les ligases de l'ubiquitine E3 .....	79
1.2.4.7.1 de type HECT .....	80
1.2.4.7.2 de type RING .....	82
1.2.4.7.3 de type RBR .....	85
1.2.4.8 Les déubiquitinases .....	86
1.2.5 Régulations des voies de signalisations MAP Kinases par le système ubiquitine-protéasome .....	89
1.2.5.1 Signalisation ERK1/2 .....	89
1.2.5.2 Signalisation p38 .....	95
1.2.5.3 Signalisation JNK .....	98
1.2.5.4 Signalisation ERK5 .....	99
1.2.5.5 Signalisation ERK7 (ERK8) .....	101
1.2.5.6 Signalisation ERK3/4 .....	102
1.2.5.7 Autres signalisations MAPK : le cas des plantes .....	104
1.2.5.8 Régulations des MAP Kinases par leur stabilité : conclusions .....	104
Hypothèses et objectifs .....	107
CHAPITRE II – Article 1 : The Deubiquitinating Enzyme USP20 Regulates ERK3 Stability and Biological Activity .....	109
2.1 Mise en situation .....	109
2.2 Abstract .....	111
2.3 Introduction .....	111
2.4 Material and methods .....	113
2.5 Results .....	116
2.5.1 The DUB USP20 regulates ERK3 protein levels by increasing its stability .....	116
2.5.2 USP20 interacts with and deubiquitinates ERK3 .....	120
2.5.3 USP20 deubiquitinates and stabilizes a lysine-less ERK3 mutant .....	123
2.5.3 USP20 regulates ERK3 protein levels in a myogenic differentiation model .....	125
2.5.4 USP20 regulates cell adhesion and migration through ERK3 .....	126
2.6 Discussion .....	130
2.7 Acknowledgments .....	132
2.8 References .....	132



CHAPITRE III – Article 2 : A Functional Screen Targeting Ubiquitination Enzymes Identify the E3 Ligase E6AP as a Regulator of ERK3 Ubiquitination and Degradation. ....	136
3.1 Mise en situation .....	136
3.2 Abstract .....	138
3.3 Introduction.....	138
3.4 Material and methods.....	140
3.5 Results.....	142
3.5.1 ERK3 is accumulated in response to inhibition of CRL4 ubiquitin ligase complexes. ....	142
3.5.2 Development of a ERK3-NanoLuc reporter system to identify regulators of ERK3 protein in cells .....	144
3.5.3 Functional RNAi screen for ubiquitin ligases and ubiquitin conjugases identifies several candidates for regulation of ERK3 turnover.....	147
3.5.4 E6AP regulates ERK3 protein levels by decreasing its stability .....	153
3.5.5 E6AP interacts with and promotes ERK3 ubiquitination. ....	154
3.6 Discussion .....	156
3.7 References.....	158
CHAPITRE IV : Discussion .....	162
4.1 La régulation de la stabilité de ERK3 .....	162
4.1.1 Les acteurs de la régulation.....	162
4.1.1.1 Existe-t-il plusieurs DUB pour ERK3 ?.....	163
4.1.1.2 Existe-t-il plusieurs E3 ligases pour ERK3 ?.....	165
4.1.1.3 Un réseau de régulateur centré autour de E6AP et USP20 ? .....	168
4.1.1.4 Les outils pour mieux comprendre l’ubiquitination N-terminale ? .....	170
4.1.2 Les contextes cellulaires de la régulation de ERK3.....	173
4.1.2.1 Le cycle cellulaire .....	173
4.1.2.2 L’hypoxie comme régulateur de la stabilité de ERK3 ? .....	174
4.1.3 Conclusion - La régulation de la stabilité de ERK3 : un système multifactoriel complexe.....	176
4.2 Les fonctions de ERK3 .....	179
4.2.1 Le rôle de ERK3 comme promoteur de la migration cellulaire.....	180

4.2.2 Le rôle de ERK3 dans la réparation de l'ADN.....	182
Conclusion .....	190
Bibliographie.....	183

## Liste des tableaux

Tableau I. Résumé de la spécificité de substrat des MAP Kinases phosphatases.....	59
Tableau II. Les différentes familles de déubiquitinasés. ....	86

## Liste des figures

### CHAPITRE 1

Figure 1.	Les différentes voies de signalisation MAP Kinases.....	22
Figure 2.	Représentation schématique de la structure des MAP Kinases. ....	24
Figure 3.	Relations moléculaires entre les kinases ERK3/4 et leur substrat MK5.....	38
Figure 4.	Fonctions connues de la signalisation ERK3/4-MK5.....	40
Figure 5.	Les rôles pro-oncogéniques de la signalisation ERK3-SRC3.....	46
Figure 6.	Activation de la voie RAF-MEK-ERK.....	52
Figure 7.	Le 26S protéasome.....	66
Figure 8.	Le processus d'ubiquitination. ....	69
Figure 9.	Différents types d'ubiquitination .....	71
Figure 10.	L'ubiquitination N-terminale .....	73
Figure 11.	Le fonctionnement des différents types de ligases de l'ubiquitine. ....	80
Figure 12.	Les différents complexes CRL.....	83
Figure 13.	Diversité structurelle des déubiquitinases.....	87
Figure 14.	Modèle de la régulation de ERK3 dans les différentes phases du cycle cellulaire. ....	104
Figure 15.	Hypothèse de la régulation de l'activité biologique de ERK3.....	107
Figure 1.	The DUB USP20 regulates ERK3 protein levels. ....	117
Figure 2.	USP13 cooperates with USP20 to regulate ERK3 protein expression. ....	119
Figure 3.	USP20 stabilizes ERK3. ....	120
Figure 4.	USP20 physically interacts with ERK3. ....	122
Figure 5.	USP20 deubiquitinates ERK3 in vivo and in vitro. ....	123
Figure 6.	USP20 regulates the ubiquitination and stability of a lysine-less ERK3 mutant.....	124
Figure 7.	USP20 controls ERK3 protein levels during myogenic differentiation.....	125
Figure 8.	USP20 regulates actin cytoskeleton dynamics and migration via ERK3. ....	127
Figure 9.	The USP20-ERK3 axis regulates the migration of breast cancer cells.....	129
Figure 1.	ERK3 accumulation in response to CRL4 ubiquitin ligases inhibition. ....	143
Figure 2.	The ERK3-Nluc reporter system. ....	146

Figure 3.	Summary of the shRNA screen to identify E2 conjugases and E3 ligases regulators of ERK3 turnover.....	148
Figure 4.	Networks of ERK3 regulators.....	150
Figure 5.	Gene Ontology (GO) analysis of ERK3 regulators. ....	152
Figure 6.	The E3 ligase E6AP regulates ERK3 protein levels by promoting its degradation. 154	
Figure 7.	E6AP interacts with and positively regulates ERK3 ubiquitination.....	155
Figure 1.	Erk3 interagit avec DDB1.....	166
Figure 2.	Prédiction des sites de SUMOylation sur la protéine ERK3. ....	167
Figure 3.	Réseau de régulateurs de ERK3 centré autour de E6AP et USP20. ....	169
Figure 4.	Augmentation de l'expression protéique de ERK3 en réponse aux dommages à l'ADN de type UV.....	170
Figure 5.	Les partenaires de UBE2W identifiés comme régulateurs potentiels de ERK3.	171
Figure 6.	L'expression protéique de USP20 est augmentée en mitose. ....	174
Figure 7.	ERK3 est un facteur de mauvais pronostic dans les cancers du sein.....	181
Figure 8.	La signalisation USP20-ERK3 régule positivement la phosphorylation de HSP27 dans des cellules HeLa.....	182
Figure 9.	ERK3 régule l'efficacité de la réparation de l'ADN par NHEJ.....	185
Figure 10.	L'extension C-terminale de ERK3 est phosphorylée par la kinase ATM. ....	188

## Liste des abréviations

ABIN-2 : A20-binding inhibitor of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-2

AMPK : 5' AMP-activated protein kinase

AP-1 : Activator protein 1

APF : ATP-dependent proteolysis factor

ASK : Apoptosis signal-regulating kinase

ATM : Ataxia-telangiectasia mutated protein

ATR : Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein

BARD1 : BRCA1 Associated RING Domain 1

BDNF : Brain-derived neurotrophic factor

BRCA : Breast cancer 1 protein

FGF : Fibroblast growth factor

BMK1 : Big MAP Kinase 1

CD : Common docking

CD : Cluster of differentiation

CD34 : Conserved domain 34

Cdc : Cell-division cycle

CDK : Cyclin dependent kinase

CHIP : C terminus of HSC70-Interacting Protein

CK2 : Casein kinase 2

CMGC : CDK, MAPK, GSK3, CDK-like

CRL : Cullin-RING ubiquitin ligases

DDB1 : Damage Specific DNA Binding Protein 1

DCAF : DDB1 and CUL4-associated factors

DLK1 : Delta like non-canonical Notch ligand 1

DN : Double négatif

DN : Dominant négatif

DSS1 : Deleted In Split Hand/Split Foot Protein

DUB : Déubiquitinase

DUSP : Dual specificity phosphatase

E6AP : E6-associated protein  
 EGF : Epidermal growth factor  
 EGFR : Epidermal growth factor receptor  
 Elk-1 : Ets-like transcription factor 1  
 ERK: Extracellular regulated kinase  
 FBXO : F-box only protein  
 FBXW : F-box and WD repeat domain containing protein  
 FGF : Fibroblast growth factor  
 FOXO : Forkhead box protein O  
 GDP : Guanosine diphosphate  
 GFP : Green fluorescent protein  
 GRB2 : Growth factor receptor-bound protein 2  
 GRWD1 : Glutamate Rich WD Repeat Containing 1  
 GSK3 : Glycogen synthase kinase 3  
 GTP : Guanosine-5'-triphosphate  
 HA : Human influenza hemagglutinin  
 HECT : Homologous to the E6AP carboxyl terminus  
 HEK : Human embryonic kidney  
 HERC : HECT And RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase  
 HIF1 $\alpha$  : Hypoxia-inducible factor 1-alpha  
 HIPK2 : Homeodomain Interacting Protein Kinase 2  
 HOIL1 : Heme-Oxidized IRP2 Ubiquitin Ligase 1  
 HOIP : HOIL-1-Interacting Protein  
 HSP : Heat shock protein  
 HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells  
 HUWE1 : HECT, UBA And WWE Domain Containing protein 1  
 IAP : Inhibitors of Apoptosis Proteins  
 IBR : In-between RING  
 IGF : Insulin-like growth factor  
 IGF2BP1 : Insulin-like growth factor 2 binding protein 1  
 IKK : Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase

IL : Interleukine  
 IQGAP1 : IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1  
 JNK : c-Jun N-terminal kinases  
 KCMF : Potassium Channel Modulatory Factor  
 KIM : Kinase interaction motif  
 KSR : Kinase Suppressor of activated Ras  
 LEF : Lymphoid enhancer factor  
 LMP : Epstein–Barr virus latent membrane protein  
 LPS : Lipopolysaccharides  
 LUBAC : Linear ubiquitin chain assembly complex  
 MAP2 : Microtubule Associated Protein 2  
 MAPK : Mitogen-activated protein kinase  
 MAPKAPK : MAP Kinase Activated Protein Kinase  
 MAPKK : Mitogen-activated protein kinase kinase  
 MAPKKK : Mitogen-activated protein kinase kinase kinase  
 MCL1 : Myeloid Cell Leukemia 1  
 MDM2 : Mouse double minute 2  
 MECL-1 : Multicatalytic Endopeptidase Complex-Like 1  
 MEF : Mouse embryonic fibroblast  
 MEK : MAPK/ERK Kinase  
 MEKK : MEK Kinase  
 MITF : Microphthalmia-associated transcription factor  
 MKP : MAPK phosphatases  
 MLK : Mixed-lineage protein kinase  
 MMS : Methyl methanesulfonate  
 MP1 : MEK partner-1  
 mTOR : Mechanistic target of rapamycin  
 NDR : N-terminal degradation region  
 NEDD8 : Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 8  
 NES : Nuclear export signal  
 NGF : Nerve growth factor



NLK : Nemo-like kinase  
 NLS : Nuclear localization signal  
 PAK : p21 activated kinase  
 PAR1 : Protease-activated receptor 1  
 PDGF : Platelet-derived growth factor  
 PHD : Prolyl-hydroxylase  
 POE : Purity of essence protein  
 PLK1 : Polo-like kinase 1  
 PP : Protein phosphatase  
 PSI : Protein stability index  
 PTEN : Phosphatase and TENsin homolog  
 PTB : Phosphotyrosine-binding  
 PTP : Protein tyrosine phosphatase  
 RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma  
 RBR : RING-between-RINGS  
 RBBP : RB Binding Protein 4, Chromatin Remodeling Factor  
 RBX1 : RING-box protein 1  
 RCPG : Récepteur couplé aux protéines G  
 RGS : Regulator of G-protein Signaling proteins  
 RING : Really interesting new gene  
 RLD : RCC1-Like Domains  
 RNF : Ring finger protein  
 Rpn : Regulatory Particle Non-ATP-ase  
 Rpt : Regulatory Particle aTp-ase  
 RSK : Ribosomal s6 kinase  
 SAPK : Stress-activated protein kinases  
 SCF : Skp, Cullin, F-box containing complex  
 SH2 : Src homology 2  
 SOCS : Suppressor of cytokine signaling  
 SOS : Son of sevenless  
 SP : Simple positif

SRC-3 : Steroid receptor coactivator 3  
 SCF : Skp1-Cullin-F-box complex  
 SOCS1 : Suppressor of cytokine signaling 1  
 SOS : Son of Sevenless  
 STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3  
 STEP : STriatal-Enriched protein tyrosine Phosphatase  
 SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier  
 TAB : Transforming growth factor- $\beta$ -activated protein kinase-1 binding protein  
 TAK1 : Transforming growth factor beta-activated kinase  
 TAO : Thousand and one amino acids protein  
 TCF : T-cell factor  
 TCR : T-cell receptor  
 TDP2 : Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2  
 TGF $\beta$  : Transforming growth factor beta  
 TLR : Toll-like receptor  
 TNF $\alpha$  : Tumor necrosis factor alpha  
 UBA : Ubiquitin Like Modifier Activating Enzyme  
 UBE2 : Ubiquitin conjugating enzymes E2  
 UBE3A : Ubiquitin-protein ligase E3A  
 UBC : Ubiquitin conjugating domain  
 UCH : Ubiquitin C-terminal hydrolase  
 UCHL : Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L  
 UFD4 : Ubiquitin fusion degradation protein  
 UIM : Ubiquitin-interacting motif  
 UPS : Ubiquitin proteasome system  
 USE1 : Uba6-specific E2 1  
 USP : Ubiquitin Specific Peptidase  
 VEGF : Vascular endothelial growth factor  
 VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor  
 VHL : Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor  
 WT : Wild-type

ZnF-UBP : Zinc finger ubiquitin-specific protease domain

*Ce qui limite une connaissance est souvent plus important, pour les progrès de la pensée, que  
ce qui étend vaguement la connaissance.*

*Gaston Bachelard, La Formation de l'esprit scientifique (1938)*

## Remerciements

Si ces remerciements sont les dernières lignes de ma thèse que j'écris, il s'agit en fait d'une partie que j'ai souvent rédigé en pensée tout au long de mon doctorat : il y en a des occasions d'être aidé et de vouloir dire merci durant toutes ces années.

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr Sylvain Meloche, mon directeur de recherche pour la confiance qu'il m'a témoigné au cours de mon doctorat et la liberté d'action qu'il m'a laissée : j'ai pu tester bon nombre de mes idées et complètement m'approprier mes travaux. Merci aussi Sylvain pour ton optimisme inépuisable face aux détours, aléas et complications de la recherche en général, et de la recherche sur ERK3 en particulier.

Je remercie les anciens et actuels membres du laboratoire que j'ai côtoyé et ceux avec qui j'ai pu travailler directement. Une pensée spéciale à Paul Délérès et Pierre-Luc Tanguay qui m'ont introduit au monde fascinant de ERK3.

Je tiens également à remercier les différents membres de mes comités de suivi, spécialement le Dr Philippe Roux qui les a présidés et dont j'ai toujours beaucoup apprécié recevoir les avis et commentaires.

Je remercie les membres des plateformes technologiques de l'IRIC pour leur soutien technique dans différentes expériences, avec une pensée particulière pour les membres de la plateforme de criblage avec qui j'ai eu l'occasion de partager des projets si excitants dans les dernières longueurs de mon doctorat.

Un merci également à tous mes amis pour le soutien moral et les moments de décompression. Je pense ici spécialement à la fine équipe des « Low Expectation Friday », qui ont su transformer les séminaires et 5à7 de l'IRIC en véritables aventures toujours plus surprenantes les unes que les autres.

Merci à ma famille pour leurs encouragements qui sont aussi efficaces à 3 ou à 3000 kilomètres. Merci à mes parents pour m'avoir donné le goût des choses littéraires qui arrondissent mes angles scientifiques. Et merci à mon père pour avoir dit « jusqu'au doctorat » lors d'une rencontre chez un conseiller d'orientation au secondaire. C'est presque fait !

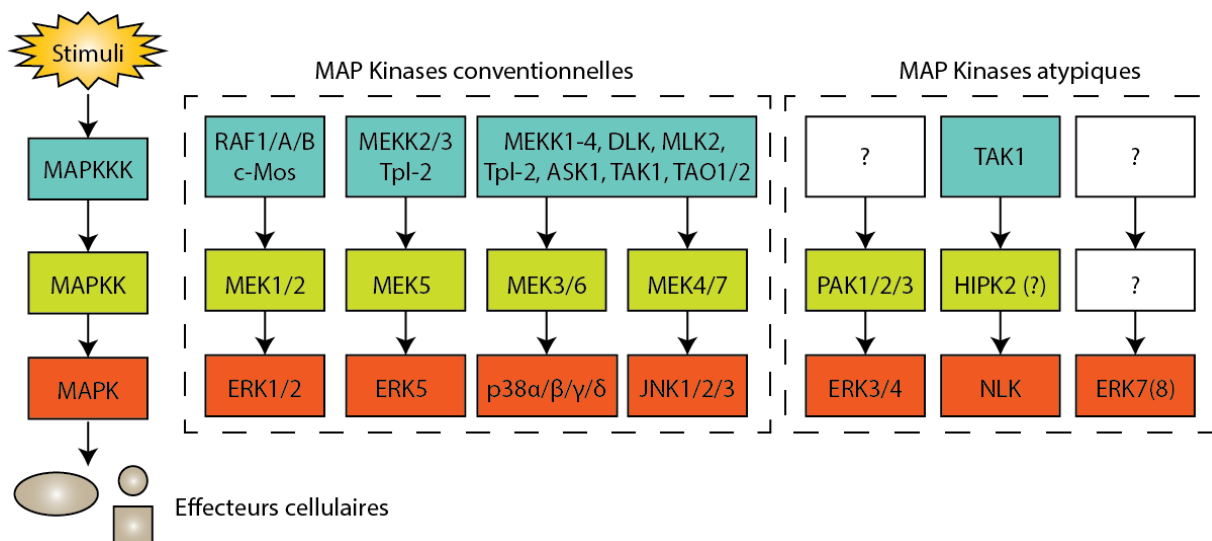
Finalement, je n'ai pas assez de mots pour remercier Magalie, mon ancienne collègue du premier étage, pour ton soutien et tes encouragements permanents, tes relectures et corrections de l'ensemble de ce que j'ai pu écrire ces dernières années, ta patience et ta

compréhension devant mes réactions à tes corrections, les interminables soirées de répétition pré-présentation, ta patience et ta compréhension lors de ces soirées, accepter que je te vole en partie tes remerciements et surtout pour ton amour et partager ma vie.

# Chapitre I : Introduction

## 1.1 Les MAP Kinases

Les Mitogen-activated Protein Kinases (MAP Kinases) sont des sérine/thréonine kinases formant une famille au sein du groupe des CMGC (CDK, MAPK, GSK3, CDK-like), conservée dans les cellules eucaryotes. La signalisation par les MAP Kinases dites conventionnelles – ou classiques - présente une organisation modulaire à trois composantes qui est elle aussi conservée dans l'ensemble du domaine eucaryote (1). La signalisation MAP Kinase est le résultat de phosphorylations successives entre ces modules. Le premier événement de phosphorylation est médié par une MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK ou MAP3K) et a pour substrat la boucle d'activation d'une MAP Kinase Kinase (MAPKK ou MAP2K). Les MAPK Kinases sont des protéines kinases à double spécificité, capable de phosphoryler des résidus sérine/thréonine ou Tyrosine. Elles catalysent le deuxième événement de cette signalisation, soit la double phosphorylation du motif Thr-X-Tyr (TXY) présent dans la boucle d'activation de toutes les MAP Kinases conventionnelles. Finalement, les MAP Kinases, qui représentent donc le dernier module de cette voie de signalisation, phosphorylent une grande variété de substrat modifiant leur activité, leur stabilité ou leur localisation et régulent donc des réponses cellulaires variées. Les MAP Kinases sont dites « proline-directed », c'est-à-dire qu'elles phosphorylent des résidus sérine ou thréonine suivis d'une proline. Il existe 7 voies MAP Kinases différentes chez les mammifères, 4 considérées comme conventionnelles et 3 qualifiées d'atypiques (Figure 1).



**Figure 1. Les différentes voies de signalisation MAP Kinases.**

Adaptée de (2)

Ce travail de doctorat s'intéresse à la régulation de l'activité biologique d'une de ces MAP Kinase atypique, ERK3. Le chapitre suivant a donc pour objet de présenter les différentes signalisation MAP Kinases et de décrire les aspects majeurs de leur régulation, en regard de la régulation de ERK3.

## 1.1.1 Les MAP Kinases conventionnelles

### 1.1.1.1 ERK1/2

Les MAP Kinases ERK1/2 appartiennent à la voie Ras/RAF/MEK/ERK1/2, qui est la voie MAP Kinase la plus étudiée et la plus caractérisée, à tel point qu'elle est parfois simplement dénommée voie MAPK. Traditionnellement associées à la prolifération et la survie cellulaire en réponse à des facteurs de croissances extracellulaires (d'où leur nom de « *extracellular-regulated kinases* »), ERK1 et ERK2 sont impliquées dans une grande variété de rôles en

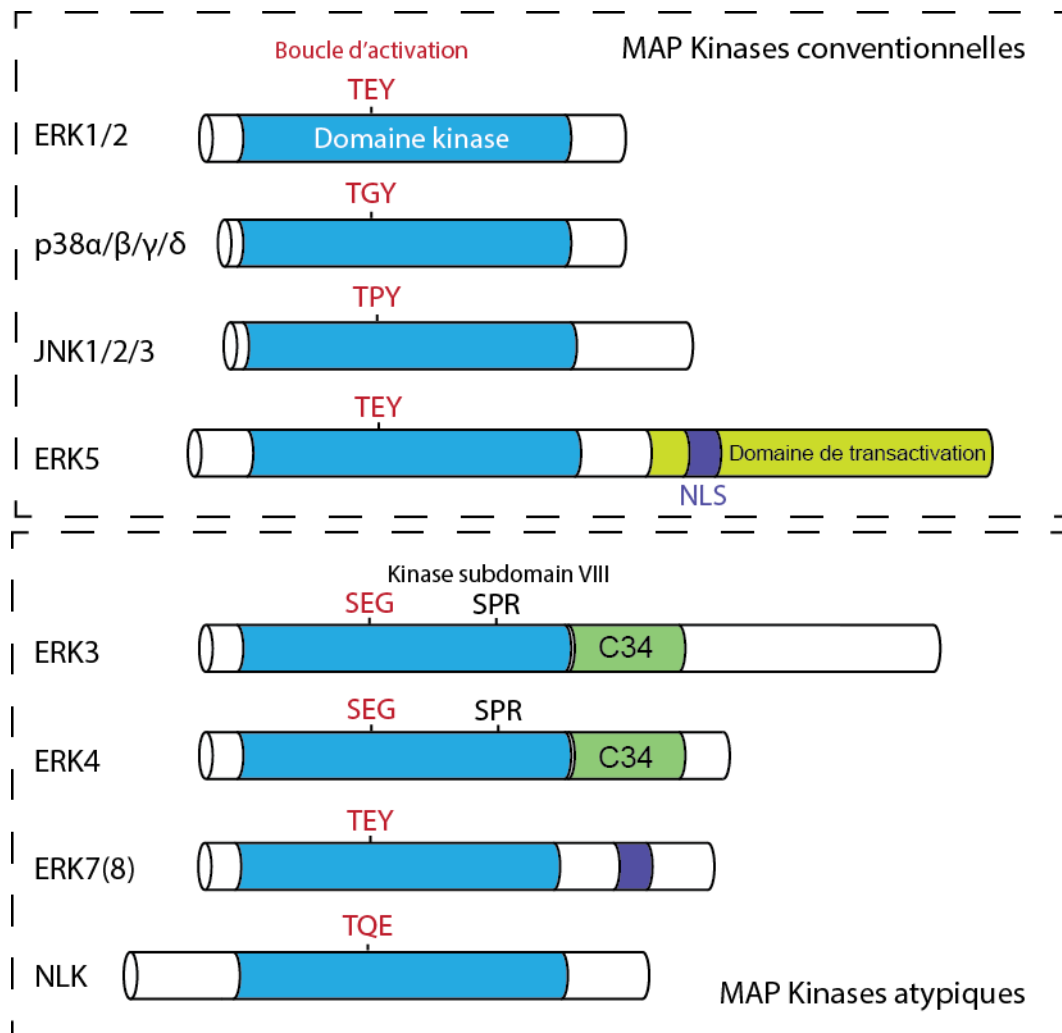


fonction du contexte biologique parmi lesquels on peut citer différenciation, migration, transcription et développement embryonnaire. Une des raisons probables de l'ampleur de l'intérêt scientifique qu'a suscité cette voie de signalisation tient dans son implication dans de nombreuses pathologies humaines au premier lieu desquelles le cancer.

### **Identification et structure**

ERK1 a été la première MAP Kinase identifiée à la fin des années 1980, par la purification de l'activité enzymatique phosphorylant la protéine « microtubule associated-protein 2 » (MAP-2) en réponse à l'insuline (3). Quelques années plus tard, au début des années 1990, le cDNA des gènes codants pour ERK1 puis celui de ERK2, respectivement nommés *MAPK3* et *MAPK1*, seront clonés par le groupe de Mélanie Cobb (4, 5).

Les deux gènes codent pour des protéines de respectivement 44 et 42 kDa qui présentent une identité de séquence de 85%. Comme toutes les MAP Kinases classiques (à l'exception de ERK5), ERK1/2 sont principalement constituées de leur domaine kinase, flanqué de courtes extensions N- et C-terminales qui confèrent aux protéines leur spécificité de signal et possèdent le motif TXY dans leur boucle d'activation (voir figure 2).



**Figure 2. Représentation schématique de la structure des MAP Kinases.**

Le domaine kinase est représenté en bleu, le phosphomotif de la boucle d'activation en rouge. Adapté de (2).

### Substrats et fonctions

Les MAP Kinases ERK1/2, sont dites « proline-directed », c'est-à-dire qu'elles requièrent un site accepteur suivi d'une proline en position +1 (sérine ou thréonine suivie d'une proline) pour pouvoir phosphoryler leur substrat. Le séquence de phosphorylation préférentielle est de la forme PXP/pTP, ce qui constitue un motif formé d'une proline en position -2, d'une sérine ou d'une thréonine (résidu qui sera phosphorylé) et de la proline en +1 (6). Les kinases

ERK1/2 sont capables de phosphoryler plus d'une centaine de substrats (7). En conséquence, la signalisation ERK1/2 est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la migration, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (voir revue (8)).

La fonction sans doute la mieux documentée de ERK1/2 est dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Étant activées par les facteurs mitogènes, il a été suggéré très tôt que ERK1/2 ont un rôle de promotion du cycle cellulaire. En conséquence, l'inhibition de l'expression des deux protéines induit un arrêt de la prolifération (9, 10). Il a été démontré qu'une activation soutenue de ERK1/2 est nécessaire à la transition G1/S (11). De la même façon, l'inhibition de la fonction MEK1/2, qu'elle soit génétique ou pharmacologique, induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (12, 13). Étant donné le rôle central de la signalisation ERK1/2 dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire et de la prolifération, les mécanismes moléculaires de cette fonction sont nombreux. Parmi ceux étant les plus caractérisés, on peut noter la régulation du complexe facteur de transcription AP-1. Cette régulation s'effectue à plusieurs niveaux, le premier événement étant la phosphorylation du facteur de transcription Elk-1 par ERK1/2 (14). Cette phosphorylation induit l'expression des gènes de réponse précoce aux mitogènes (IE pour « Immediate-early genes »), notamment de c-fos (14). De plus, ERK1/2 phosphoryle directement la protéine c-Fos, induisant sa stabilisation, et permettant son interaction avec c-Jun, formant ainsi le complexe AP-1 (15). Le facteur de transcription actif AP-1 induit à son tour l'expression de la cycline D1, essentielle à la progression du cycle cellulaire, notamment à la transition G1/S (16, 17). La signalisation *via* les MAPK activated protein kinase (MAPKAPK) RSK1 et RSK2 est une autre composante importante de la fonction pro-proliférative de ERK1/2. Les RSK sont une famille de kinases, substrats de ERK1/2 (voir revue (2)). De manière intéressante, c-Fos est aussi un substrat de RSK (15). RSK phosphoryle également l'inhibiteur du cycle cellulaire p27, induisant sa séquestration cytoplasmique et réprimant ainsi l'inhibition de la kinase promotrice du cycle cellulaire CDK2 (18).

Étant donné le rôle primordial de la signalisation ERK1/2 dans la prolifération, de nombreux inhibiteurs ont été développés dans une optique thérapeutique anticancéreuse, ciblant notamment RAF et MEK1/2 (voir revue (19) pour les inhibiteurs de MEK).

En plus de leur rôle dans le contrôle de la prolifération, les kinases ERK1/2 ont un rôle important dans la différenciation. Si ce rôle peut paraître surprenant de premier abord pour des protéines aussi importantes pour la promotion de la prolifération, le contexte cellulaire, ainsi que le type de signal généré par ERK1/2 permettent de discriminer entre une fonction pro-proliférative ou pro-différenciation. La maturation des thymocytes représente un des processus de différenciation pour lequel ERK1/2 semble être essentielle. En effet, leur absence induit un blocage de la transition DP/SP associé à un défaut de sélection positive chez la souris (20). De manière intéressante, ce phénotype reflète celui observé pour les souris déficientes en ERK3, et l'expression de cette dernière est régulée en partie par ERK1/2 dans ce contexte cellulaire (21, 22).

La différenciation des cellules souches embryonnaires (ES) est un autre processus notable dépendant en partie de l'activité de ERK1/2. En effet, l'inhibition du signal de différenciation induit par ERK1/2 est nécessaire au maintien des cellules ES dans un processus d'auto-renouvellement (23).

Étant donné leur rôle dans la prolifération et la différenciation, il est peu surprenant de constater que les protéine ERK1/2 ont un rôle essentiel dans le développement embryonnaire. Les altérations de la voie ERK1/2 sont associées à plusieurs maladies congénitales regroupées sous le nom de « RASopathies » (voir revue (24)). Chez la souris, il a été démontré qu'un niveau minimal d'activité combinée de ERK1/2 est nécessaire pour l'embryogenèse (25). Cette étude, menée dans notre laboratoire, a de plus permis de démontrer que les deux kinases sont complètement redondantes pendant l'embryogenèse murine.

Finalement les kinases ERK1/2 ont de nombreux autres rôles, notamment dans le contrôle de la croissance cellulaire et de la traduction des ARN. On peut aussi noter un rôle dans la survie cellulaire, la transformation et la sénescence, qui expliquent que cette voie de signalisation soit impliquée dans les processus d'oncogenèse. Ainsi l'activation de la voie

ERK1/2, classiquement par les mutations oncogéniques de Ras ou Raf, est capable d'induire la transformation de cellules immortalisées (26). Dans d'autres contextes, notamment de cellules primaires, cette même activation induit la sénescence : il s'agit d'un phénomène de « sénescence induite par les oncogènes » (27). La voie ERK1/2 peut donc transduire un signal pro- ou anti-tumoral dépendamment du contexte cellulaire.

#### **1.1.1.2 JNK et p38**

Bien que formant chacune une voie de signalisation différente et ayant chacune leurs fonctions distinctes, les isoformes des MAP Kinases JNK et p38 partagent de nombreuses caractéristiques dont celle d'être associées à la réponse aux différents stress cellulaires. La sous-famille des c-Jun N-terminal kinases (JNK) comprend trois gènes distincts JNK1/2/3 aussi appelés Stress-activated protein kinases (SAPK). Elles jouent notamment un rôle dans le contrôle de la signalisation pro-apoptotique. Les quatre isoformes de p38 (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  et p38 $\delta$ ) forment une voie de signalisation extensivement étudiée, en raison de son implication dans plusieurs processus cellulaires importants comme la différenciation, l'apoptose ou l'autophagie et en raison du potentiel thérapeutique des inhibiteurs de p38, spécifiquement dans les pathologies inflammatoires.

#### **Identification et structure**

Le premier membre de la famille des JNK a été identifié par purification d'une activité enzymatique dirigée contre la protéine MAP-2, en réponse au cycloheximide (28). Trois ans plus tard, des travaux indépendants d'un autre groupe de recherche identifient une kinase de la protéine c-Jun qui sera nommée JNK (29). Les gènes codants pour JNK1,2 et 3 seront finalement identifiés et clonés l'année suivante par deux groupes différents (30, 31). Il existe en tout une dizaine d'isoformes de JNK générés par épissage alternatif à partir de ces trois gènes (32).

La kinase p38 $\alpha$  a été la première isoforme de p38 à être identifiée en 1994, par trois groupes de recherche distincts, comme une nouvelle MAP Kinase étant activée par les stress cellulaires (33-35). Les isoformes p38 $\beta$  (36), p38 $\delta$  (37, 38) et p38 $\gamma$  (39, 40), toutes codées par des gènes différents, ont été identifiées et clonées dans les trois années suivantes.

Les différentes isoformes de JNK sont des protéines de poids moléculaires variant entre 46 et 55 kDa qui partagent entre elles une homologie de séquence de plus de 85% (31). Les isoformes de p38 partagent quant à elles approximativement 60 % d'identité dans leur séquence en acides aminés. Elles possèdent toutes le motif de phosphorylation TXY caractéristique des MAP Kinases conventionnelles dans leur boucle d'activation (Figure 1).

### **Substrats et fonctions**

Les signalisations JNK et p38 sont activées simultanément par de nombreux stimuli. Néanmoins dans la plupart de ces cas, les deux voies ont des effets antagonistes.

Le substrat le plus caractérisé de JNK est sans doute le facteur de transcription cJun, qui en combinaison avec cFos forment le complexe AP-1 (41, 42). La formation de ce complexe est essentielle à l'induction des gènes de réponse précoce, notamment de la cycline D1, nécessaire à la progression du cycle cellulaire et la prolifération (voir chapitre 1.1.1.2). En conséquence, des fibroblastes déficients en JNK1/2 expriment des niveaux anormalement bas de cycline D1 et leur prolifération est inhibée (43, 44). A l'inverse p38 est décrit comme un régulateur négatif du cycle cellulaire, induisant un délai du cycle cellulaire à la transition G1/S *via* l'inhibition de l'expression de la cycline D1 (45). De plus p38 est aussi un médiateur du point de contrôle G2/M induit par les stress génotoxiques, notamment par la phosphorylation de p53 (46-48). De manière intéressante, il a été suggéré que la fonction antiproliférative de p38 est effectuée au moins en partie par son antagonisme de la signalisation JNK-cJun (49).

La signalisation p38 joue un rôle primordial dans la réponse immune et inflammatoire, par l'intermédiaire des isoformes p38 $\alpha/\beta$ . La délétion de p38 $\alpha$ , dans les cellules épithéliales et

les cellules myéloïdes, induit une diminution de la production de cytokine pro-inflammatoires en réponse à une stimulation par les lipopolysaccharides (LPS) telles que le « tumor necrosis factor alpha » (TNF $\alpha$ ), les interleukines (IL) IL-12 et IL-18, et donc une diminution de l'ampleur de la réponse inflammatoire (50, 51). La signalisation JNK est elle aussi associée à l'inflammation, notamment à l'expression du TNF $\alpha$ , dans des pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde, la maladie inflammatoire chronique de l'intestin ou les carcinomes hépatocellulaires, qui sont fortement associés à l'inflammation du foie (52-54).

La voie JNK joue un rôle important dans le contrôle de la balance entre apoptose et survie en réponse aux stress cellulaires. La résistance à l'apoptose induite par les stress génotoxiques dans les fibroblastes murins déficients en JNK1/2 illustre bien cette fonction (55). Dans ce modèle, il a été démontré que JNK est essentiel au relargage cytoplasmique du cytochrome C et donc à l'induction de l'apoptose (55). La voie p38 possède quant à elle des rôles pro- et anti-apoptotiques dépendamment des contextes. Ainsi p38 est un inducteur de l'apoptose dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses, et a en conséquence été décrit comme un suppresseur de tumeur (56-58). Au contraire plusieurs études décrivent un rôle pour p38 comme promoteur de la survie (59, 60). Les signalisation JNK et p38 peuvent donc potentiellement collaborer ou avoir un effet antagoniste dans le contrôle de l'apoptose et de la survie cellulaire dépendamment des contextes cellulaires.

### **1.1.1.3 ERK5**

#### **Identification et structure**

Comme p38, la kinase ERK5 a été identifiée par trois groupes de recherche indépendants quasi-simultanément en 1995 (61-63). Étant donné sa grande taille, approximativement 100 kDa, elle a initialement aussi été nommée BMK1 pour « big MAP Kinase 1 » (62). La famille ERK5 est composée d'un seul gène, mais il existe trois variants d'épissage ERK5a, b et c (64).

La partie N-terminale de ERK5 comporte un domaine kinase qui partage 50% d'identité de séquence avec ERK1/2. Sa partie C-terminale est unique au sein de la famille des MAP Kinases et contient un signal de localisation nucléaire NLS et un domaine de transactivation (voir figure 2).

### **Substrats et fonctions**

Comparativement aux autres MAP Kinases conventionnelles, on connaît beaucoup moins les substrats et les fonctions de la protéine ERK5. On sait néanmoins que ERK5, de manière comparable à ERK1/2, est un régulateur positif du cycle cellulaire et de la prolifération en réponse à des agents mitogènes, notamment par sa promotion de la transition G1/S *via* la régulation de l'expression de la cycline D1 (65, 66). La kinase ERK5 partage aussi la famille des kinases RSK comme substrat avec ERK1/2 (67).

Finalement, ERK5 est nécessaire au développement embryonnaire. Les souris *Erk5*<sup>-/-</sup> meurent au cours du développement et présentent des défauts majeurs dans la genèse du système cardio-vasculaire (68-70). En addition à ce rôle dans un contexte physiologique, ERK5 est aussi importante pour l'angiogenèse tumorale (71).

A cause de ces rôles dans la prolifération et l'angiogenèse, la signalisation ERK5 est actuellement considérée comme une cible potentielle pour le développement de thérapies anticancéreuses (voir revue (72)).

### **1.1.2 Les MAP Kinases atypiques**

Les MAP Kinases atypiques se différencient des MAP Kinases conventionnelles par des particularités structurelles, la plus importante étant l'absence du motif de double phosphorylation TXY dans leur boucle d'activation, à l'exception de ERK7 (73-75). Du fait de ces particularités structurelles, les MAP Kinases atypiques ne sont pas activées par les MAP2Ks et leur signalisation n'est donc pas organisée en un système modulaire à trois



niveaux classiques. On connaît beaucoup moins les mécanismes moléculaires de contrôle de l'activité des MAP Kinases atypiques, sans doute parce qu'elles ne partagent ces mécanismes ni entre-elles, ni avec les MAP Kinases classiques. Les MAP Kinases atypiques sont relativement hétérogènes, il s'agit donc d'un groupe « par défaut », dont la principale caractéristique commune est de ne pas appartenir au groupe des MAP Kinases conventionnelles.

### **1.1.2.1 NLK**

#### **Identification et structure**

Nemo-like kinase (NLK) a été identifiée en 1994 par une stratégie de PCR visant à identifier des homologues aux MAP Kinases conventionnelles (76). Comme son nom l'indique NLK est homologue de la protéine Nemo, une kinase impliquée dans le développement de la *Drosophila* (77). Des homologues chez les organismes modèles *C. elegans* et chez *X. laevis*, ont aussi été identifiés et ont fait l'objet d'études permettant d'élucider les fonctions cellulaires de NLK.

Le domaine kinase de NLK possède 45% d'homologie avec celui de ERK2. Sa boucle d'activation possède un seul site phospho-accepteur. De plus, NLK possède des extensions N- et C-terminales qui n'ont pas d'équivalent chez les MAP Kinases conventionnelles (voir figure 2). Ces particularités structurelles sont les raisons pour lesquelles NLK est considérée comme une MAP Kinase atypique. L'extension C-terminale de NLK semble être impliquée dans son interaction avec certains de ces substrats (78).

#### **Substrats et fonctions**

Contrairement à la plupart des MAP Kinases atypiques, les substrats identifiés de NLK sont relativement nombreux. On sait par exemple que NLK phosphoryle directement les facteurs de transcription de la famille « T-cell factor/lymphoid enhancer factor » (TCF/LEF), STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), FOXO1 (Forkhead box protein

O1), c-Myb ainsi que la sous-unité Raptor du complexe mTORC1, ce qui suggère que la signalisation NLK est impliquée dans une grande variété de processus cellulaires (78-83). En revanche le rôle physiologique de certaines de ces phosphorylations n'est pas connu.

La fonction cellulaire la plus documentée de NLK est la modulation de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine dans le développement. A partir d'études dans les organisme modèles, il a été montré que les homologues de NLK phosphorylent les homologues de TCF/LEF, régulant ainsi le développement embryonnaire en potentialisant la signalisation Wnt (78, 84, 85). La protéine NLK humaine est aussi capable de phosphoryler des protéines TCF/LEF dans les lignées cellulaires humaines HeLa et HEK293 et dans des progéniteurs neuronaux mammaliens (86, 87). En revanche dans les lignées HeLa et HEK293, NLK apparaît être un régulateur négatif de la fonction de facteur de transcription des protéines TCF/LEF. La kinase NLK semble donc être capable de promouvoir ou d'antagoniser la signalisation Wnt/  $\beta$ -caténine dépendamment du contexte cellulaire. Si les mécanismes moléculaires, notamment la caractérisation des différentes phosphorylations, restent à élucider, il semblerait que la présence de certaines protéines partenaires des facteurs TCF/LEF, notamment de la déacétylase HDAC1, peuvent influencer pour un rôle positif ou négatif de NLK dans la signalisation Wnt/  $\beta$ -caténine (87).

Les rôles de NLK dans le développement ne se limitent pas à la modulation de la signalisation Wnt/  $\beta$ -caténine. En effet, NLK a un rôle de promotion de l'embryogenèse chez *X. laevis* au travers de sa phosphorylation activatrice du facteur de transcription STAT3 (79). De plus, il a été démontré que NLK phosphoryle la partie intracellulaire du récepteur de Notch, inhibant ainsi sa signalisation (88). Ce mécanisme de contrôle est important, puisque la perte d'expression de NLK induit une suractivation de la voie Notch chez le poisson zèbre qui interfère avec la formation du système nerveux (88). En concordance avec ces observations, la protéine NLK semble essentielle au développement embryonnaire chez la souris. En revanche le phénotype observé dépend du fond génétique utilisé. En effet, les souris de type C57BL/6 *Nlk*<sup>-/-</sup> meurent au cours de l'embryogenèse (89). En revanche, les souris ayant un fond génétique 129/Sv arrivent à terme, mais ne survivent pas jusqu'à l'âge adulte et présentent des

anomalies hématopoïétiques causées par une différenciation anormale des cellules stromales de la moelle épinière (89).

#### **1.1.2.2 ERK7 (ERK8)**

##### **Identification et structure**

La MAP Kinase atypique ERK7 a été identifiée chez le rat par une stratégie de PCR visant à identifier des homologies de séquence avec le domaine kinase de ERK1 (90). Son homologue humain a ensuite été identifiée et nommée ERK8 (74). Bien qu'il n'existe que 69% d'homologie de séquence entre les deux protéines, il n'existe pas de kinase plus similaire à ERK7 que ERK8 dans le kinome humain (91).

La protéine ERK7 humaine (ERK8) est composée de 544 acides aminés, avec un domaine kinase dans sa partie N-terminale (voir figure 2). Contrairement aux autres MAP Kinases atypiques, ERK7 possède le motif de double phosphorylation TEY dans sa boucle d'activation. Toutefois, en raison de son extension C-terminale de 204 résidus, qui n'est présente dans aucune MAP Kinase conventionnelle, et du fait qu'elle n'est pas un substrat des MAP2Ks, ERK7 est considérée comme une MAP Kinase atypique. L'extension C-terminale de ERK7 est considérée jouer un rôle dans l'activation et la localisation de ERK7.

##### **Substrats et fonctions**

La signalisation ERK7 est sans doute la moins caractérisée de toutes les MAP Kinases, conventionnelles ou atypiques. Le seul substrat *in vivo* identifié serait la protéine de régulation de l'actine capZIP (92). En revanche, ERK7 (et ERK8) phosphoryle le substrat classique des MAP Kinases MBP, bien que ERK7 semble avoir une spécificité différente de ERK1/2 puisque les sites qu'elle phosphoryle sur MBP sont différents de ceux de ERK1/2 (90, 93).

Étant donné le peu de connaissance sur les substrats de ERK7, il n'est pas étonnant de constater que les fonctions cellulaires de ERK7 sont peu connues. Toutefois des études de perte de fonctions dans des lignées cellulaires ont permis de démontrer que la signalisation

ERK7 semble importante pour le contrôle de la prolifération (90), la stabilité génomique (94), la signalisation par les récepteurs aux hormones stéroïdes (95-97), le contrôle de la sécrétion protéique en réponse aux carences du milieu en acides aminés (98, 99) et la signalisation intracellulaire de l'oncogène BCR-ABL1 (100). Toutefois, les bases cellulaires et moléculaires de ces fonctions restent à élucider.

En revanche, l'étude du rôle de ERK7 dans le développement embryonnaire de *X. laevis* a permis d'identifier sa fonction dans la genèse de cils cellulaires. L'inhibition de l'expression de ERK7 à l'aide de morpholinos induit des défauts de développement, notamment au niveau de l'élongation de l'axe antéro-postérieur et de l'organisation de l'épiderme, causés par une absence de fonction des cellules multi-ciliées (92). Cette même étude a permis de démontrer que la kinase ERK7 forme un complexe avec les protéines Disheveled et CapZIP qui semble induire la phosphorylation de cette dernière par ERK7. Cette phosphorylation est nécessaire à la migration du corps basal, indispensable à la morphogenèse des cils cellulaires. Cette fonction de ERK7 dans le développement semble donc être celle qui est la mieux caractérisée pour la protéine.

### **1.1.2.3 ERK3 et ERK4**

Bien qu'identifiées à la même période que ERK1/2, l'importance de la production scientifique consacrée à ERK3 et ERK4 a été considérablement moins importante. Une des raisons potentielles pour expliquer cet état de fait pourrait être l'absence de possibilité d'utiliser les organismes modèles classiques : ERK3 et ERK4 sont en effet uniquement présentes chez les vertébrés. Il est donc impossible d'utiliser la levure, le nématode ou la drosophile pour identifier les rôles potentiels de ERK3 et ERK4. Il en résulte que leurs régulations, mais surtout leurs fonctions biologiques sont moins comprises et caractérisées.

### **Identification et structure**

Les gènes *Mapk6* (codant pour ERK3) et *Mapk4* (ERK4) ont initialement été identifiés par clonage par homologie de séquence à la MAP Kinase ERK1 respectivement en 1991 et 1992 (4, 101). Ces travaux initiaux laissaient penser que *Mapk6* de rat codait pour une protéine de 543 acides aminés. Quelques années plus tard, les séquences humaines et murines de *MAPK6* ont à leur tour été identifiées et clonées (102-104). De manière surprenante, si les différents orthologues affichaient une identité de séquence de l'ordre de 90%, les protéines murines et humaines possédaient une extension C-terminale de 178 acides aminés absente chez le rat. Il sera alors déterminé que le séquençage initial du gène codant pour ERK3 chez le rat comportait une erreur d'un nucléotide résultant en l'apparition d'un codon stop prématuré. Il sera finalement confirmé par traduction *in vitro* et par immunoblot que les différents orthologues de *MAPK6* codent pour une protéine de 720 (721 chez l'Homme) acides aminés d'une taille de 100 kDa (104, 105).

De manière surprenante, la séquence initialement rapportée pour le gène codant pour ERK4 chez l'humain comportait elle aussi une erreur. Le rapport original faisait état d'une protéine de 557 acides aminés et d'une masse moléculaire prédite de 63 kDa, qui sera donc nommée p63<sup>mapk</sup>. Il sera finalement établi que les gènes *ERK4* humains et murins codent pour une protéine de 587 acides aminés (106). Il est intéressant de noter qu'en plus de cette erreur initiale concernant la séquence du gène *Mapk4*, il semble y avoir eu confusion sur une protéine identifiée par immunoréactivité anti-ERK1 et identifiée comme ERK4 à tort (107, 108). Or ces études pointent vers une phosphorylation d'une tyrosine en réponse aux facteurs de croissance, médiée par une voie de signalisation dépendante de Ras, de la même façon que les kinases ERK1/2. De par ses propriétés structurales (cf. paragraphe ci-dessous), il apparaît donc peu probable que cette protéine soit ERK4. Philippe Coulombe, dans sa revue de littérature traitant des MAP Kinases atypiques a émis l'hypothèse qu'il pourrait s'agir de ERK1b, un variant d'épissage de ERK1 (73).

Les kinases ERK3 et ERK4 sont des protéines de respectivement 100 et 70 kDa. Elles possèdent un domaine kinase dans leur partie N-terminale avec une identité de séquence de 73%, qui présente une homologie avec ERK1 de 50% pour ERK3 et 42% pour ERK4. Les deux protéines possèdent une extension C-terminale absente chez les autres MAP Kinases classiques (figure 2). Il existe au sein de cette extension C-terminale une région conservée entre ERK3 et ERK4, appelée CD34 pour « conserved domain in Erk3 and Erk4 ». En dehors

de ce domaine, l'identité de séquence entre ERK3 et ERK4 dans l'extension C-terminale est de l'ordre de 30%. Il n'a pas été établi que cette extension joue un quelconque rôle dans la régulation de la protéine ERK4. En revanche, il a été démontré que l'extension C-terminale de ERK3 (qui est plus longue de 143 acides aminés que celle de ERK4) est importante pour la localisation et le contrôle de la stabilité de la protéine, mais aussi pour certaines interactions protéines-protéines, notamment avec la cycline D3 et la phosphatase Cdc14 (109, 110). Au niveau de leur boucle d'activation, ERK3 et ERK4 ne possèdent pas le motif classique de double-phosphorylation mais un motif avec un simple site phospho-accepteur SEG. Finalement, elles présentent toutes deux la séquence SPR dans le sous-domaine VIII de leur domaine kinase à la place du motif APE, très conservé chez les MAP Kinases (figure 2). Il s'agit d'ailleurs des seules kinases du génome humain qui possèdent une arginine à cet endroit. Ces trois particularités structurelles sont la raison pour laquelle on considère ERK3 et ERK4 comme des kinases atypiques.

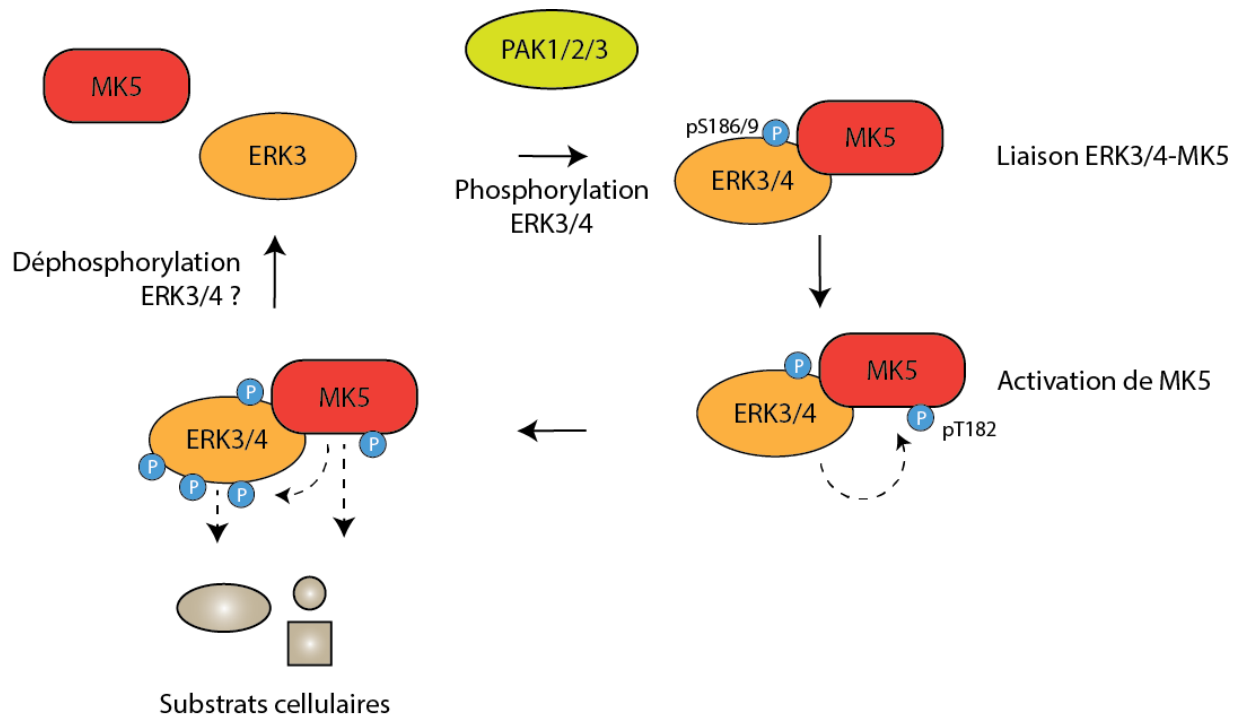
### **Substrats**

Les MAP Kinases conventionnelles comme ERK1/2 sont des kinases multifonctionnelles qui phosphorylent plus d'une centaine de substrats connus (7). Les kinases ERK3 et ERK4, au contraire, semblent être beaucoup plus restreintes dans leur variété de substrats. En effet, elles ne phosphorylent pas les substrats génériques des MAP Kinases comme les protéines MAP-2, c-Jun ou Elk-1 (111). Il a récemment été suggéré que le récepteur nucléaire co-activateur steroid receptor coactivator 3 (SRC-3) et la Tyrosyl DNA phosphodiesterase 2 (TPL2) sont des substrats de ERK3 (112, 113). Néanmoins, la caractérisation de ces relations biochimiques est encore très préliminaire. En effet, les tentatives d'identification des sites de phosphorylation de TPL2 par ERK3 se sont révélées infructueuses (113). De plus, les études s'intéressant à la phosphorylation de SRC-3 ont été réalisées en immunoprécipitant ERK3 à partir de cellules 293T. Or il a déjà été démontré que l'immunoprécipitation de ERK3 dans des cellules 293T mène systématiquement à la co-purification de la kinase MK5 (114)(P. Délérès et S. Meloche, données non publiées). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que le site de phosphorylation identifié sur SRC-3, la sérine

857, est située dans un motif avec une arginine en position -3 (R-X-X-pS), ce qui représente une séquence consensus pour la phosphorylation par MK5. De plus, bien que nous ne connaissions à l'heure actuelle qu'un seul site de phosphorylation bien caractérisé pour ERK3, la thréonine 182 de la boucle d'activation de MK5, il s'agit d'un site suivi d'une proline. Les données dont nous disposons laissent donc penser que ERK3, comme les autres MAP Kinases, serait une « proline-directed kinase ». Le site S857 de SRC-3 est suivi d'une leucine (112).

Si ces substrats potentiels de ERK3 identifiés récemment sont encore relativement peu caractérisés, en revanche les relations biochimiques entre ERK3/4 et la MAP Kinase activated protein kinase (MAPKAPK) MAPKAPK5, ou plus simplement MK5, ont fait quant à elles l'objet de nombreuses études. Ainsi, il a été démontré que ERK3 et ERK4 interagissent avec la protéine MK5 et phosphorylent la thréonine 182 dans sa boucle d'activation (106, 115-117). De plus, ces études ont permis de montrer que l'interaction entre ERK3 ou ERK4 et MK5 induit une relocalisation cytoplasmique des complexes protéiques, mais aussi que cette interaction stabilise la protéine ERK3. Finalement ces travaux ont établi que ERK3 et ERK4 sont des régulateurs physiologiques de l'activité de MK5. De manière surprenante, si l'activité kinase de ERK4 est requise pour activer MK5, son activation par ERK3 semble être plus complexe. En effet, il semblerait que ERK3 catalyse directement la phosphorylation de la Thr182, mais aussi qu'elle joue un rôle de protéine échafaud induisant une autophosphorylation de MK5 (115, 116). De plus les régulations croisées entre ERK3/4 et MK5 semblent avoir un niveau de complexité supérieure (figure 3). Ainsi il semblerait que l'interaction entre ERK3/4 et MK5 favorise le recrutement des kinases de la boucle d'activation de ERK3 et ERK4. La phosphorylation des résidus Ser186/189 subséquente induirait la stabilisation des complexes ERK3/4-MK5, l'activation totale de ERK3/4 et donc la phosphorylation de la Thr182 de la boucle d'activation de MK5. La forme activée de MK5 catalyserait alors la phosphorylation de ERK3 et ERK4 sur des sites en dehors de la boucle d'activation dont l'identité reste à déterminer (114, 118). Le fait que ERK3 et ERK4 nécessite la phosphorylation de leur boucle d'activation pour lier MK5 démontre que la manière dont elles interagissent avec leurs kinases effectrices diffère des MAP Kinases conventionnelles. En effet, s'il est bien présent chez ERK3/4, le domaine CD n'est pas nécessaire à l'interaction avec MK5 (119). Il existe en revanche un motif FRIEDE conservé chez ERK3 et ERK4 qui est essentiel pour la liaison au domaine C-terminal de MK5 (119). Toutefois, si ce modèle a

été démontré dans des modèles expérimentaux avec des protéines exogènes, les protéines ERK3/4 semblent être constitutivement phosphorylées sur leur boucle d'activation. La pertinence de ce modèle reste donc à évaluer pour la régulation des protéines endogènes.



**Figure 3. Relations moléculaires entre les kinases ERK3/4 et leur substrat MK5.**

Résumé des évènements de phosphorylation et d'interactions entre les kinases ERK3/4 et leur substrat MK5.

### Fonctions cellulaires

Le nombre restreint de substrats connus pour ERK3 et ERK4 est certainement une des raisons qui explique que leurs fonctions cellulaires sont encore à ce jour peu élucidées comparativement aux MAP Kinases conventionnelles. De plus, et de manière paradoxale, l'identification de MK5 comme substrat pour ERK3 et ERK4 n'a que faiblement contribué à comprendre le rôle de ERK3 et ERK4. En effet, MK5 est elle aussi relativement peu comprise, comparativement aux autres MAPKAPKs. D'autre part, les fonctions de MK5 les mieux



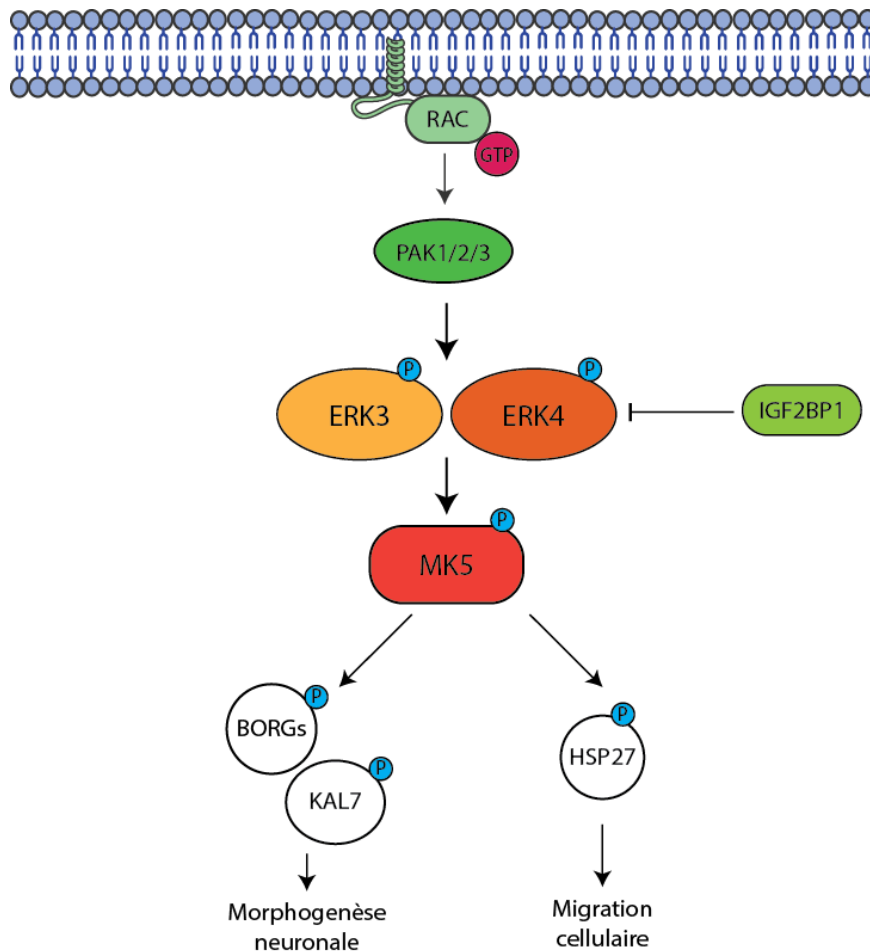
décrites semblent être indépendantes de ERK3/4. Néanmoins, les études réalisées *in vitro* sur des modèles de lignées cellulaires, mais surtout des modèles murins déficients pour leur expression respective ont permis de suggérer des rôles potentiels pour ERK3, et dans une moindre mesure pour ERK4, dans le contrôle de la prolifération, de la migration et de la différenciation cellulaire.

### **Les fonctions dépendantes de MK5**

Le rôle le mieux défini de MK5 le présente comme un suppresseur de tumeur qui régule la sénescence induite par les oncogènes et contrôle négativement l'expression de l'oncoprotéine Myc (120-123). Cependant, les résultats publiés dans ces études ainsi que les observations de notre laboratoire laissent penser que ces fonctions sont indépendantes de ERK3 et ERK4 (Klinger S., Brégeon J. et Meloche S., données non publiées). D'autre part, le rôle de MK5 comme régulateur de la sénescence est actuellement controversé : certains des résultats présentés n'ont pu être reproduits par des équipes de recherche indépendantes (124). D'après ces mêmes auteurs, la divergence de résultats provient de la stratégie de génie génétique employée pour supprimer l'expression de MK5. Les études qui décrivent un rôle suppresseur de tumeur pour MK5 utilisent en effet un modèle animal tronqué à partir de l'exon 8 ( $\Delta$ ex8), au contraire des autres études qui utilisent un modèle où le gène est avec une délétion plus en amont ( $\Delta$ ex6). Il en résulte qu'une activité enzymatique aberrante correspondant à MK5 peut être détectée dans les modèles  $\Delta$ ex8, ce qui d'après ces auteurs expliquerait le phénotype de suppression de tumeur (124). Il est donc difficile de déterminer, en l'état actuel des connaissances, si l'absence d'implication pour ERK3/4 dans la suppression de tumeur par MK5 est due à une fonction indépendante de ce dernier.

En revanche, il a été montré plus récemment, en collaboration avec notre laboratoire, que la voie ERK3-MK5 est impliquée dans la morphogenèse des neurones. Les résultats de cette étude montrent que la signalisation ERK3-MK5 phosphoryle les protéines « Binders of Rho GTPases » (BORG) ainsi que le facteur d'échange nucléotidique Kalirin-7, induisant la modification de la morphologie des épines dendritiques et donc le branchement de neurones primaires issues de l'hippocampe (125). De plus, une étude réalisée sur la protéine de liaison à

l'ARN IGF2BP1 a montré que cette dernière augmente la vitesse de la migration de cellules U2OS en antagonisant la signalisation ERK4-MK5-HSP27 *via* l'inhibition de la traduction de l'ARNm de ERK4 (126).



**Figure 4. Fonctions connues de la signalisation ERK3/4-MK5.**  
Illustration des différentes signalisation ERK3-MK5 et ERK4-MK5 décrites dans la littérature.

### Rôle dans le développement et la différenciation

L'idée d'un rôle potentiel de ERK3 dans le développement et la différenciation cellulaire provient des observations réalisées à partir des souris mutantes *Erk3*<sup>-/-</sup>. Ainsi, la

perte de ERK3 induit un retard de croissance intra-utérin associée à une mortalité néo-natale. De plus, les nouveaux-nés *Erk3*<sup>-/-</sup> présentent un délai de maturation pulmonaire induisant un défaut de sacculisation et différenciation des pneumocytes de type II (127). Ce phénotype modélise le syndrome de détresse respiratoire néonatale, une complication observée dans 1% des naissances aux États-Unis chaque année et dans approximativement 50% des naissances prématurées avant la 30<sup>ème</sup> semaine (128). De manière intéressante, la mortalité néo-natale et la détresse respiratoire chez les souris *Erk3*<sup>-/-</sup> peuvent être atténuées par l'administration de glucocorticoïdes anténataux et de surfactant après la naissance, ce qui correspond à la thérapie employée chez les prématurés humains (129).

En plus de ce phénotype pulmonaire, les souris *Erk3*<sup>-/-</sup> présentent une diminution des taux circulants de l'hormone « insuline-like growth factor 2 » (IGF2) qui semble être causée par une diminution de la transcription du gène (127, 130). Il est intéressant de noter que les souris déficientes en IGF2 présentent elles aussi un retard de croissance intra-utérin associé à un défaut de développement des poumons qui peut être compensé par un traitement à la corticostérone (131, 132). Il n'est à l'heure actuelle pas déterminé si la restauration des taux sériques d'IGF2 atténuerait le phénotype développemental des souris *Erk3*<sup>-/-</sup>.

Ce rôle dans le développement semble être spécifique à ERK3. En effet les souris *Erk4*<sup>-/-</sup> ont un développement embryonnaire normal, atteignent l'âge adulte sans phénotype apparent et sont fertiles (133). Il convient toutefois de noter que des études comportementales poussées ont montré que ces animaux performant moins bien dans des tests de nages forcées, suggérant que les souris *Erk4*<sup>-/-</sup> sont plus susceptibles aux phénotypes associés à la dépression (133). Curieusement, la perte d'expression de *Erk4* dans un contexte où *Erk3* est déjà absent ne potentialise pas les phénotypes observés chez les souris *Erk3*<sup>-/-</sup>. Toutes ces informations suggèrent que les deux kinases ont un rôle non redondant dans le développement.

En plus de ces données de développement embryonnaire, certaines études indiquent que ERK3 aurait une fonction dans la différenciation et la maturation des thymocytes. Ces travaux, menés en collaboration avec notre laboratoire, ont permis de montrer que des embryons de souris *Erk3*<sup>-/-</sup>, mais aussi de souris chimériques dont le système hématopoïétique n'exprime pas ERK3, présentent une diminution de la survie des thymocytes doubles positifs CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (21). En conséquence, les thymocytes *Erk3*<sup>-/-</sup> ne peuvent survivre aux rondes successives de réarrangement de la chaîne  $\alpha$  de leur TCR qui s'opèrent à ce stade. Finalement,

les mêmes groupes de recherche ont montré un phénotype additionnel chez les thymocytes. Ainsi, ERK3 semble participer au contrôle de la sélection positive des thymocytes (22). Ces travaux montrent en effet que l'absence de ERK3 prévient l'augmentation d'expression du TCR et du marqueur CD69 associée à la sélection positive. En conséquence, la génération des lignées simples positives CD4 et CD8 est altérée chez les animaux mutants pour ERK3. Toutefois, bien que ces deux études démontrent un rôle clair pour ERK3 dans différentes étapes de la maturation des thymocytes, les mécanismes moléculaires sous-jacents sont toujours inconnus.

### **Rôle dans le contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération**

S'il existe plusieurs indications dans la littérature qui pointent vers un rôle pour ERK3 dans le contrôle de la prolifération cellulaire, il n'est pas clairement défini. En effet, les niveaux d'expression de ERK3 sont augmentés durant la différenciation de cellules P9 et PC12 en neurones et de myoblastes C2C12 en myotubes, phénotypes associés à l'arrêt de la prolifération (4, 134). De plus, la surexpression de forme stables de la protéine inhibe l'entrée de fibroblastes en phase S (134, 135). Finalement, dans des modèles de lignées cellulaires dérivées de carcinomes hépatocellulaires il semblerait que le miRNA miR499a promeut la prolifération cellulaire en inhibant l'expression de ERK3 (136). En revanche, ERK3 semble être un régulateur positif de la prolifération des cellules endothéliales et des lymphocytes T lors de leur activation en réponse à une stimulation de leur TCR (21, 112, 137). De plus, sa perte d'expression n'affecte pas la prolifération de nombreux types cellulaires, notamment de fibroblastes embryonnaires murins issus de souris *Erk3*<sup>-/-</sup> (133 ; P.L Tanguay et S. Meloche, résultats non publiés). En addition de ces études fonctionnelles, il existe des données moléculaires qui pourraient suggérer un rôle de ERK3 dans le contrôle de la prolifération, notamment son interaction avec les protéines régulatrices du cycle cellulaire cycline D3 et Cdc14A/B (109, 110). De plus, ERK3 est phosphorylée sur son extension C-terminale à l'entrée en mitose et déphosphorylée à la transition M/G1 par Cdc14A/B (138). Le rôle de ces phosphorylations sur le contrôle de la stabilité de ERK3 est abordé au chapitre 2.5.8. Il n'existe à ce jour pas d'informations liant ces données moléculaires à un rôle de ERK3 dans le contrôle du cycle cellulaire.

Il n'existe que très peu d'informations décrivant un rôle pour ERK4 dans le contrôle de la prolifération et du cycle cellulaire. Il semblerait toutefois que ce rôle puisse exister puisqu'une inhibition de l'expression de ERK4 par shRNA induit une diminution de la prolifération de cellules endothéliales HUVEC (139). De manière intéressante ce phénotype est le même que celui observé pour l'inhibition de ERK3 par siRNA (137). Toutefois, il n'existe pas de données qui évaluent la redondance du rôle des deux kinases dans le contrôle de la prolifération des cellules HUVEC puisqu'une double inhibition n'a jamais été réalisée.

### **Les fonctions pro-oncogénique de ERK3**

En raison de leur rôle putatif dans la différenciation et la prolifération, ERK3 et ERK4 peuvent apparaître comme de bons candidats de gènes impliqués dans le cancer. De plus, l'expression de ERK3 semble altérée dans plusieurs types de cancers humains et modèles expérimentaux de cancers. Ainsi, l'expression de ERK3 est augmentée dans les tissus d'individus présentant un carcinome de cellules squameuses de la bouche associé à la mastication du tabac, comparativement aux tissus sains (140). De plus, cette même étude montre que les sujets atteints de cancers présentent une expression de ERK3 plus élevée dans les cellules du sang périphérique, ce qui laisse penser que les individus exprimant plus de ERK3 pourraient présenter un risque accru de développer un cancer oral associé à la consommation de tabac par mastication. D'autres études s'intéressant aux cancers colorectaux et gastrique ont montré qu'approximativement 50% des individus étudiés présentait une augmentation de l'expression protéique de ERK3 comparativement aux tissus sains adjacents (141, 142). De plus, des études transcriptomiques à grande échelle ont montré que l'expression du transcrit de ERK3 est augmentée dans des mélanomes et dans des cellules issues de cancers mammaires (143, 144). Finalement, l'étude menée par le groupe de Bert W. O'Malley qui a conduit à l'identification de SRC-3 comme un substrat de ERK3 a montré que l'expression du transcrit et de la protéine ERK3 est augmentée dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules humains (112).

En plus de ces données issues de patients, il existe aussi des évidences de modulation de l'expression de ERK3 dans des modèles expérimentaux d'oncogenèse. Ainsi qu'énoncé précédemment, la mutation oncogénique V600E de B-Raf induit une augmentation de

l'ARNm et de la protéine ERK3 dans des fibroblastes murins en culture (145). Dans un modèle de souris transgénique Smgb-Tag qui développe des adénocarcinomes invasifs au niveau des glandes salivaires, l'expression du transcrit pour ERK3 montre une augmentation dans les tissus dysplasique et d'adénocarcinomes comparés aux tissu normal (146).

Comparativement à ERK3, il existe beaucoup moins d'informations sur l'expression de ERK4 dans le cancer, néanmoins il semble que dans un modèle d'induction de carcinomes pulmonaires par l'expression de l'oncogène K-Ras dans des souris transgénique, l'expression de l'ARNm de ERK4 soit augmentée (147).

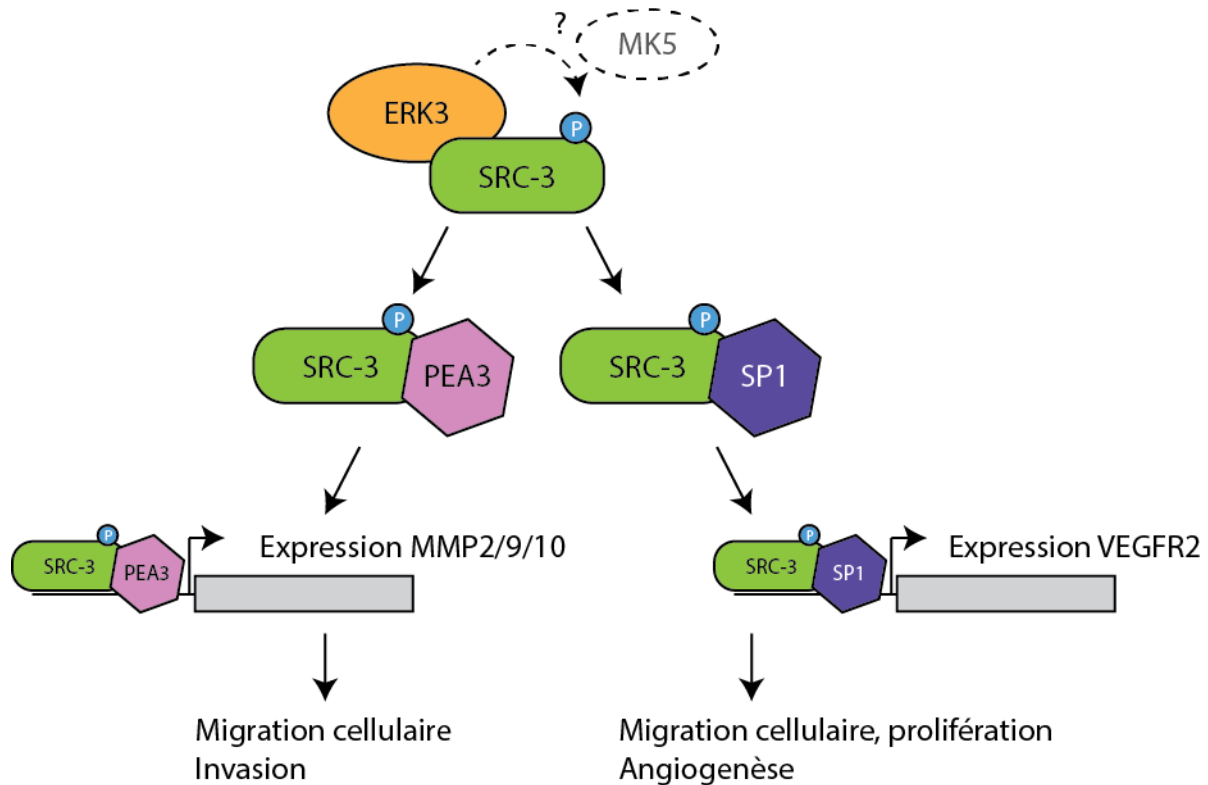
Il n'existe que très peu d'informations concernant les mutations rapportées dans les séquences des gènes codants pour ERK3 et ERK4 dans les différents types de cancers. Toutes ces données de séquences proviennent d'études à grande échelle, et rien ne permet de déterminer à l'heure actuelle s'il s'agit de mutations passagères ou non. Toutefois, la faible fréquence à laquelle elles sont observées laisse penser qu'il n'existe pas de mutations récurrentes de ERK3 ou ERK4 associée à la tumorigenèse. Il existe néanmoins certaines mutations qui apparaissent dans plusieurs types de cancers. Les données publiées sur le portail de données du projet TCGA indiquent que c'est le cas notamment de la mutation R114C/H située dans le domaine kinase de ERK4, retrouvée dans des carcinomes colorectaux, des gliomes, des cancers du poumons à non petites cellules et des mélanomes (148). La mutation R399Q, présente sur ERK3, est quant à elle présente dans des échantillons issus de cancers utérins, mammaires, colorectaux et mélanomes (148). Finalement, les mutations E331D/D336N et H333D/N apparaissant respectivement chez ERK4 et ERK3 sont situées dans sa séquence d'interaction avec MK5 (119). Il n'existe toutefois aucune information qui permet de déterminer si ces mutations ont un quelconque effet sur la fonction de ERK3 ou ERK4.

Sur la base des données d'expression et de mutations, il apparaît peu probable que ERK3, et à plus forte raison ERK4, ai une implication majeure dans la transformation oncogénique. En effet, la plupart des gènes ayant un rôle majeur dans l'apparition ou la progression tumorale présente un profil d'expression altéré ou des mutations dans de nombreuses études à grande échelle. En revanche, il existe des données, pour leurs majorités issues d'études réalisées sur des lignées cellulaires cancéreuses, qui laissent penser que ERK3 aurait un rôle dans la progression tumorale.

La fonction la plus documentée en relation avec la progression tumorale concerne la migration et l'invasion cellulaire. Les études du groupe de Bert W. O'Malley sur ERK3 et SRC-3 ont en effet montré que la perte d'expression de ERK3 inhibe la migration de cellules endothéliales humaines et de lignée issue de carcinomes pulmonaires (112, 137). De plus, dans ce dernier modèle, l'expression de ERK3 potentialise la fonction pro-invasive de SRC-3 *in vitro* et *in vivo* (112). Finalement, il a récemment été montré que la surexpression de ERK3 modifie l'organisation du cytosquelette d'actine, promeut l'adhésion et la vitesse de migration de différentes lignées de cancers du sein (149). Il est intéressant de considérer cette nouvelle fonction pour ERK3 en regard de ce qui est décrit pour la voie ERK4-MK5-HSP27 dans le contrôle de la motilité des cellules U2OS (126). Toutefois, les études se concentrant sur ERK3 ne contiennent pas d'informations sur l'implication éventuelle de MK5 dans ces rôles.

En plus de son rôle pro-migratoire, ERK3 contrôle d'autres fonctions dans les lignées endothéliales HUVEC qui lui confèrent un rôle putatif dans la progression tumorale. En effet, en plus de son effet sur la migration, l'inhibition de l'expression de ERK3 diminue la prolifération cellules endothéliales HUVEC. De plus, lors de la stimulation au TNF $\alpha$ , ces cellules forment normalement une structure en forme de tube qui est considérée comme un modèle d'angiogenèse *in vitro* (150). La diminution des niveaux d'expression de ERK3 inhibe la formation de tube dans ce modèle ce qui suggère que ERK3 pourrait jouer un rôle dans l'angiogenèse associée à la progression des tumeurs solides. Les mécanismes moléculaires de cette fonction ne sont pas totalement caractérisés, néanmoins, il semblerait que ERK3 soit nécessaires à l'expression du récepteur au VEGF, VEGFR2 dans ce type cellulaire *via* son activation de SRC-3 (137). Finalement, il convient de rappeler que si le rôle de ERK4 dans les modèles d'angiogenèse *in vitro* ne semble pas avoir été étudiée précisément, il a été précédemment indiqué que l'expression de ERK4 semble être nécessaire à la prolifération normale des cellules endothéliales humaines *in vitro* (139). De manière surprenante, cette même étude, dont l'objectif était de démontrer un nouveau rôle pour MK5 dans la migration des cellules endothéliales et l'angiogenèse tumorale, rapporte des phénotypes pour la perte d'expression de MK5 qui sont similaires avec ceux décrits pour ERK3 (137). Or les auteurs y décrivent une fonction pro-angiogénique de MK5 indépendante de ERK3 et ERK4. Il existe toutefois des différences expérimentales, notamment dans l'utilisation de TNF $\alpha$  ou de VEGF

pour stimuler l'activation (qui correspond à la prolifération, la migration et la formation de tubes) des cellules endothéliales. Il est donc possible que MK5, ERK3 et/ou ERK4 bien que générant des phénotypes semblables interviennent dans des processus distincts de l'angiogenèse *in vitro*.



**Figure 5. Les rôles pro-oncogéniques de la signalisation ERK3-SRC3.**

Dépendamment du contexte cellulaire, la signalisation ERK3-SRC3 peut activer l'expression des MMPs (cellules issues de carcinomes pulmonaires) ou de VEGFR2 (cellules endothéliales). L'implication de la kinase MK5 dans cette signalisation n'est pas clairement déterminée.

Finalement, il existe un rapport qui, sans décrire un rôle pour ERK3 dans la progression tumorale *per se*, suggère que la protéine pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour les problématiques de résistance aux chimiothérapies. En effet, ces auteurs ont montré que ERK3, *via* sa régulation de la phosphodiesterase TPL-2, promeut la réponse aux dommages à l'ADN en réponse aux inhibiteurs de topoisomérase 2 utilisé en thérapie (113). L'inhibition de ERK3 sensibilise des cellules issues de carcinomes pulmonaires aux traitements avec ces



mêmes agents. Toutefois cette étude n'indique pas si ce processus est dérégulé dans les cancers humains. Il n'existe aucune information publiée concernant le rôle de ERK4 dans la réponse aux dommages à l'ADN.

En conclusion, une littérature récente semble indiquer des fonctions cellulaires pour ERK3 compatibles avec un rôle potentiel dans la progression tumorale. Il est intrigant de noter que ces fonctions décrivent des rôles pour ERK3 intrinsèques aux cellules cancéreuses, mais aussi dans le microenvironnement tumoral comme l'atteste la fonction putative de ERK3 dans l'angiogenèse. Néanmoins, il n'existe encore que peu d'informations qui montrent que ERK3 est altérée dans un contexte de cancer. D'autre part, en dehors d'informations anecdotiques, les données de la littérature ne permettent pas d'associer la fonction de ERK4 à la tumorigenèse.

### **1.1.3 Régulation de l'activité des MAP Kinases**

La régulation de l'activité de la MAP Kinase ERK3 est atypique au sein de la famille des MAP Kinases. Le but de ce chapitre est de décrire en détails les régulations connues de l'activité de ERK3, mais aussi de dresser un portrait des principales régulations de l'activité de l'ensemble des MAP Kinases, afin de mettre celles de ERK3 en contexte.

#### **1.1.3.1 Contrôle de l'expression des MAP Kinases**

Le contrôle de l'expression d'une protéine est la somme de plusieurs régulations allant de l'activité transcriptionnelle à la régulation de l'abondance de la protéine. Étant donné l'importance de la régulation de la stabilité des protéines dans mon travail de doctorat, ce dernier aspect est abordé au chapitre 2.5.

##### **1.1.3.1.1 MAP Kinases conventionnelles**

Le contrôle de l'expression des MAP Kinases conventionnelles est sans doute un des aspects les moins étudiés de leur régulation. Il est souvent estimé que leur expression est constitutive et que le contrôle de la phosphorylation de leur boucle d'activation est l'élément majeur du contrôle de leur activité. De manière concordante avec cette idée, la surexpression de ERK1 ou de ERK2, si elle augmente l'abondance protéique des kinases, ne semble pas augmenter la quantité de protéine phosphorylée sur sa boucle d'activation (25). Il existe toutefois des profils d'expression pour certaines des MAP Kinases conventionnelles qui peuvent conférer des fonctions spécifiques aux signalisations dans certains tissus ou à certains stades du développement.

Les protéines ERK1 et ERK2 sont exprimées de manière ubiquitaire, avec une expression maximale observée dans le cerveau, le muscle squelettique, le thymus et le cœur chez la souris (4). Les deux protéines sont aussi exprimées dans la plupart des lignées cellulaires avec un profil d'expression qui peut toutefois être variable (151).

La kinase p38 $\alpha$  a une expression significative dans la plupart des types cellulaires. Les autres isoformes présentent une expression plus restreinte et limitée à certains tissus. Par exemple p38 $\beta$  est fortement exprimée dans le cerveau, p38 $\gamma$  dans les muscles squelettiques et p38 $\delta$  dans les glandes endocrines (36, 37, 40). Les isoformes JNK1/2 sont des enzymes ubiquitaires, en revanche l'expression de JNK3 est principalement limitée au système nerveux central (152). Les gènes des différents isoformes de JNK sont sujets à un épissage alternatif dépendant des tissus, pour un total de 10 isoformes. En conséquence ces différents tissus expriment un répertoire distincts d'isoformes épissés de JNK (153). L'expression de JNK et p38 peut être dérégulée dans certains cancers, toutefois en fonction du contexte tumoral, ces modifications semblent corrélées avec des rôles oncogéniques ou suppresseurs de tumeurs (voir revue (154)). Certains des mécanismes de régulation de p38 commencent à être caractérisés, il a par exemple été démontré que les miRNA miR-141 et miR-200 contrôlent le niveau d'expression de p38 dans les adénocarcinomes ovariens (155).

Finalement, la kinase ERK5 est exprimée dans la plupart des tissus, mais son expression est maximale dans le cerveau, le thymus et la rate (70). Le maximum d'expression est atteint au stade E15-18 de l'embryogenèse murine et décline progressivement après la naissance (156). L'expression de ERK5 semble être amplifiée dans certains types de cancers,

notamment les cancers du sein et les hépatocarcinomes (157, 158). Dans le contexte de lignées cellulaires issues de cancers de la vessie, de la prostate et de lymphomes de type B, *miR-143* et *miR-145*, qui régulent négativement l'expression de ERK5, sont sous-exprimés. Leur réexpression induit une diminution significative de l'expression de ERK5 (159-161).

#### **1.1.3.1.2 MAP Kinases atypiques : NLK et ERK7**

La MAP Kinase atypique NLK est faiblement exprimée dans la plupart des tissus de souris adultes, à l'exception du cerveau où l'expression est forte (76). L'expression du gène codant pour NLK est régulée dynamiquement au cours du développement embryonnaire murin : elle est détectable à partir du jour E10.5 et augmente jusqu'à atteindre un maximum à jour E12.5, stade à partir duquel elle diminue jusqu'au jour 18.5 (76). Il n'existe que peu d'information sur l'expression de NLK dans les cancers humains, mais deux études suggèrent que l'expression de la protéine est diminuée dans des tumeurs mammaires et ovariennes comparativement au tissu sein adjacent (162, 163).

On connaît peu d'informations sur le contrôle de l'expression de la MAP Kinase ERK7. Le gène codant pour ERK7 semble être majoritairement exprimé au niveau du poumon et des reins chez l'humain (164). Contrairement aux autres MAP Kinases, aucune souris mutante pour ERK7 n'a été générée en laboratoire, et on ne connaît donc pas son profil d'expression au cours du développement. Finalement, une étude récente suggère que ERK7 est surexprimée à cause d'un gain du nombre de copies du gène dans les carcinomes gastriques comparativement aux adénomes ou au tissu sain, ce qui serait associé à un mauvais pronostic pour les patients (165).

#### **1.1.3.1.3 ERK3 et ERK4**

Chez les mammifères adultes le gène codant pour ERK3 est exprimé de manière ubiquitaire, mais avec des niveaux d'expression variables. L'expression est la plus forte au niveau du cerveau, du muscle squelettique et de l'appareil digestif (104). Le gène ERK4 présente un profil d'expression plus restreint, mais montre, lui aussi, une expression maximale

au niveau du cerveau (133). De manière intéressante, au cours du développement murin l'expression des deux gènes est similaire : elle est maximale au jours embryonnaires 9 à 11, ce qui correspond à la période de l'organogenèse (16, 22, 23(104, 127, 133, 166)).

Les études menées *in vitro* montrent que de nombreux stimuli sont capables de stimuler l'expression de l'ARNm de ERK3. La situation la plus documentée est celle de la différenciation *in vitro* : c'est le cas pour la différenciation de cellules de carcinome embryonnaires P19 vers une lignée neuronale ou musculaire, la différenciation myogénique de myoblastes C2C12, la différenciation chémo-induite de cellules Raji (107, 134, 167). De manière intéressante, des travaux réalisés *in vivo* chez la souris, auxquels j'ai collaboré pendant mon doctorat, associent eux aussi une régulation de l'expression de Mapk6 lors de la différenciation. Ainsi, lors de la différenciation des thymocytes, l'expression de ERK3 augmente progressivement du stade double-négatif 1 (DN1) au stade DN4 puis diminue lors des phases plus tardives double-positif et simple-positif (21).

Il a aussi été montré que l'expression de l'ARN messager de ERK3 est augmenté en réponse au cytokines TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  et au facteur de croissance bFGF dans des cellules endothéliales humaines HUVEC (137). Cette étude a de plus permis de démontrer que le facteur de transcription c-Jun lie le promoteur du gène Mapk6 et régule son activité transcriptionnelle en réponse au TNF $\alpha$ . Finalement, ERK3 est induit dans des lymphocytes T en réponse à une stimulation via leur T-cell receptor (TCR) (22). De manière intéressante cette étude montre une augmentation d'expression de ERK3 dépendante de la voie RAF-MEK-ERK, ce qui est en accord avec une autre étude qui montre que l'expression de ERK3 est augmentée par des mutations activatrices de B-Raf (145). Finalement, le miRNA miR499a régule négativement l'expression de ERK3 dans un contexte de modèle *in vitro* d'hépatocarcinome induit par l'hépatite B (136).

Comparativement à ERK3, on connaît moins de contexte où l'expression de ERK4 est modulée. On sait en revanche que la protéine de liaison à l'ARN IGF2BP1 (Insulin-like growth factor 2 binding protein 1) inhibe la traduction de l'ARNm de ERK4 (126).

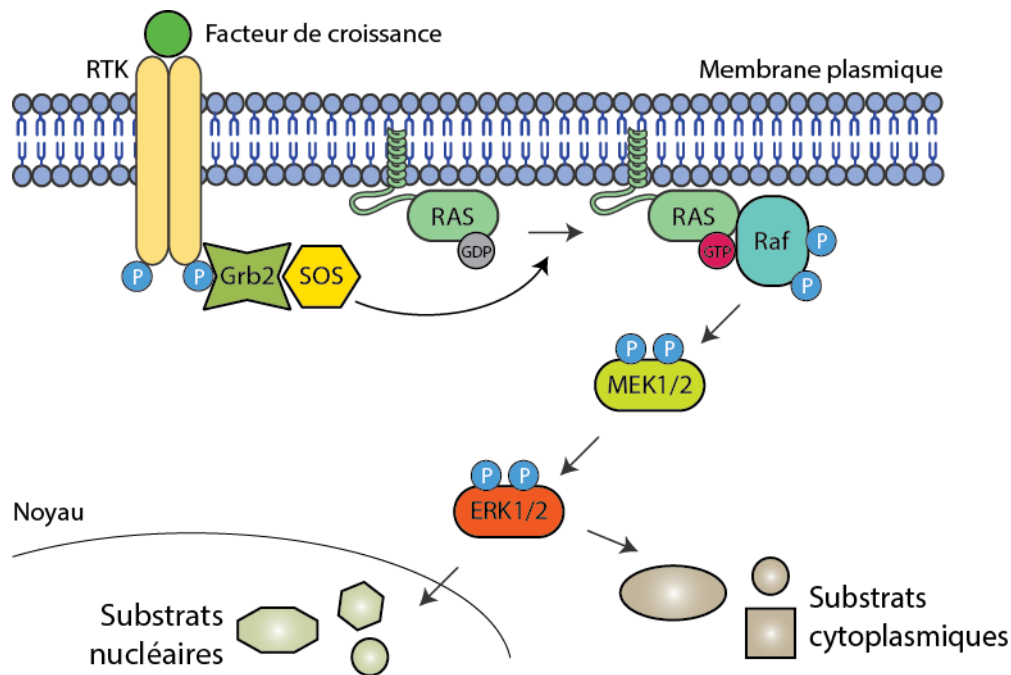
### 1.1.3.2 Phosphorylation de la boucle d'activation

Les MAP Kinases requièrent la phosphorylation de sites phospho-accepteurs dans leur boucle d'activation pour être actives. Pour la majorité des MAP Kinases cette phosphorylation est régulée de manière dynamique et contrôlée. A l'exception de ERK3/4 et ERK7, il est généralement considéré que la régulation de la boucle d'activation est le principal mécanisme de contrôle de l'activité de chacune des voies MAP Kinases. Le contrôle de la phosphorylation de la boucle d'activation de chacune des MAP Kinases est le résultat de l'activité des différents modules qui forment les cascades de signalisation MAP Kinase.

#### 1.1.3.2.1 ERK1/2

L'activation des MAP Kinases ERK1/2 est modulée par les protéines A-Raf, B-Raf et C-Raf (MAP3K), MEK1 et MEK2 (MAP2K) (figure 1). La voie de signalisation est activée par une multitude de stimuli extracellulaires, mais est traditionnellement associée aux facteurs de croissance tels que le « epidermal growth factor » (EGF), le « platelet-derived growth factor » (PDGF) ou l'insuline (5). Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), différentes cytokines, ainsi que le stress osmotique et la désorganisation des microtubules peuvent aussi activer la voie ERK1/2 (voir revue (168). La stimulation de la voie ERK1/2 mène à l'activation parallèle de ERK1 et de ERK2 (169). L'activation prototypique de la voie ERK1/2 est déclenchée par les récepteurs tyrosine-kinase (voir figure 6). La liaison d'un facteur de croissance induit l'homodimérisation de son récepteur transmembranaire qui s'autophosphoryle alors sur ses résidus Tyrosine intracellulaires. Ces modifications post-traductionnelles favorisent alors la liaison de protéines possédant des domaines « Src homology 2 » (SH2) ou « phosphotyrosine-binding » (PTB). Dans le cas de la réponse à l'EGF, la protéine Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) interagit avec le récepteur EGFR *via* son domaine SH2 (170). Cette interaction permet le recrutement à la membrane d'une autre protéine partenaire de Grb2, le facteur d'échange nucléotidique SOS (Son Of Sevenless) (171). La protéine SOS active alors la GTPase Ras, elle-même présente à la

membrane, en catalysant la transition d'un complexe GDP-Ras à un complexe GTP-Ras. Cette forme active de Ras lie directement la MAP3K Raf, induisant un ensemble d'événement d'interaction – notamment la formation d'un dimère Raf – et de phosphorylations complexes qui aboutit à la transmission d'un signal sous la forme de la phosphorylation des MAP2K MEK1/2 (voir revue (172)). Les kinases MEK1/2 une fois activées, elles phosphorylent alors ERK1/2 sur le motif TEY de leur boucle d'activation. Une fois activées, ERK1/2 transfère au noyau, ce qui est essentiel à son rôle dans la progression du cycle cellulaire (173).



**Figure 6. Activation de la voie RAF-MEK-ERK.**

Le processus d'activation de la voie ERK1/2 décrit ci-dessus de manière simplifiée, et résumé à la figure 6, est contrôlé par plusieurs mécanismes, notamment par la présence de protéines échafaudages. La protéine échafaudage de la voie ERK1/2 la plus connue est sans doute la protéine « Kinase Suppressor of activated Ras » (KSR). Cette protéine a d'abord été identifiée comme un régulateur fonctionnel positif de la signalisation Ras/ERK1/2 (174, 175). Au niveau moléculaire, KSR interagit directement Raf, MEK et ERK1/2 et potentialise la phosphorylation de MEK par Raf (176-178). La protéine KSR est elle-même sujette à la phosphorylation par la protéine ERK1/2, ce qui induit un rétrocontrôle négatif sur la

signalisation Raf/MEK/ERK, notamment *via* la déstabilisation de KSR (179, 180). La protéine KSR est donc un régulateur de l'intensité et de la temporalité de la voie ERK1/2. Finalement, il existe d'autres protéines adaptatrices de la voie Raf/MEK/ERK, notamment les protéines IQGAP1 (IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1), MEK partner-1 (MP-1) ou la  $\beta$ -arrestine qui modulent l'activité de la voie (voir revue (181)).

#### 1.1.3.2.2 JNK et p38

Les signalisations JNK et p38 sont toutes deux activées par de nombreux types de stress intracellulaires et environnementaux comme le choc thermique, les stress génotoxiques, le stress oxydatif et les cytokines inflammatoires (voir revue (182) et (183)). Certains récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont aussi capables d'activer la voie JNK, la voie p38, ou les deux. Ainsi, le récepteur adrénergique  $\alpha 1B$  active JNK et p38, tandis que le récepteur muscarinique M3 active uniquement JNK (184, 185). En revanche certains RCPG, comme le récepteur activé par les protéases PAR1 activent uniquement la signalisation p38 (186).

Une des raisons des similarités dans les stimuli activateurs des voies JNK et p38 est sans doute le fait que les deux signalisations partagent un grand nombre de MAP3K activatrices (voir figure 1). Parmi celles-ci MEKK1-4, MLK1-3, Tpl-2, TAK1, ASK1/2 et TAO1/2 semblent activer les deux voies de signalisation.

Il existe en revanche une spécificité entre les voies JNK et p38 au niveau du module MAP2K. Les MAP2K physiologiques de p38 sont MEK3 (ou MKK3) et MEK6 (MKK6) (187-189). Les deux enzymes semblent requises pour activer l'ensemble de la voie p38, puisque certaines isoformes de p38 sont activées par MEK3 et MEK6, tandis que p38 $\beta$  semble être activée préférentiellement par MEK6 (190). De plus la kinase MEK4 (MKK4) phosphoryle p38 *in vitro* et semble être un activateur de sa signalisation dans un contexte déficient en MEK3 et MEK6 (191, 192). Les MAP2K de JNK sont MEK4 et MEK7. Les deux kinases agissent en synergie pour activer les isoformes de JNK (193).

En plus de ces voies d'activations classiques des MAP Kinases, il existe une régulation non-canonique de l'activité de p38 $\alpha$ , indépendante des MAP2K. La protéine TAB1 (TGF-Beta-Activated Kinase 1 And MAP3K7-Binding Protein 1), par ailleurs un activateur de la MAP3K TAK1, peut en effet directement interagir avec p38 $\alpha$ , induisant un changement de conformation de cette dernière. Cette structure promeut l'autophosphorylation et l'activation de p38 (194, 195). Ce mode de promotion de l'activité de p38 est notamment observé dans le cadre de la signalisation par les RCPG, où l'ubiquitination du récepteur induit la formation d'un complexe TAB2/TAB1/p38 menant à l'activation de la signalisation (186).

De manière intéressante, il existe une interaction entre les voies p38 et JNK pour le contrôle de leur activation. En effet, l'inhibition chimique ou génétique de p38 induit une augmentation de l'activation de JNK dans de nombreux modèles cellulaires (49, 196, 197). Dans ces études le mécanisme proposé pour ce mode de contrôle serait une régulation négative des MAP3K TAK1 et MLK3 par p38 $\alpha$ . Dans le cas de TAK1, cette régulation serait médiée par une phosphorylation inhibitrice directe de la MAP3K par p38 (196). De plus, dans des myoblastes issus de souris déficientes en p38 $\alpha$ , la signalisation JNK est plus activée que dans les myoblastes WT, induisant des défauts de différenciation (198). Dans ce dernier cas, la suractivation de JNK est corrélée avec une diminution d'expression de la phosphatase inhibitrice MKP1 (voir chapitre 1.3.3). Finalement, une inhibition de JNK dans les hépatocytes induit une augmentation de la phosphorylation de p38 (199). Il semble donc qu'il existe des régulations réciproque entre les signalisation JNK et p38.

#### **1.1.3.2.3 ERK5**

La signalisation ERK5 est activée par les facteurs de croissance tels que NGF et le BDNF, et agents mitogènes EGF, VEGF, FGF2 ainsi que par les stress oxydatifs et d'hyperosmolarité (1, 66, 200-204). La seule MAP2K connue pour phosphoryler la boucle d'activation de ERK5 est MEK5 (61, 63). MEK5 est phosphorylée et activée par les MAP3K



MEKK2 et MEKK3 (205, 206). La signalisation ERK5 partage donc les MAP3K des signalisation JNK et p38.

Le fonctionnement de la voie ERK5 est régulée par les interactions entre les différents modules. Ainsi MEKK2/3 et MEK5 interagissent par leur domaine PB1 (Phox, Bemp1) respectifs (207, 208). D'autre part, la partie N-terminal de ERK5 interagit avec le domaine PB1 de MEK5 (209). Ces interactions sont sujettes à régulation, notamment par les ubiquitine ligases « Inhibitors of Apoptosis Proteins » (IAPs), XIAP et cIAP1 : ces dernières interagissent directement avec MEKK2/3 et catalysent leur polyubiquitination, inhibant la formation du trimère MEKK2/3/MEK5/ERK5 (210).

#### **1.1.3.2.4 NLK**

La MAP Kinase atypique NLK est activée par les stimuli de la voie de signalisation Wnt, et par certaines cytokines telles que l'IL-6 et le TGF $\beta$  (79, 83, 211). Les mécanismes moléculaires de NLK sont certainement les moins compris parmi toute la famille des MAP Kinases. Ainsi s'il est établi que la MAP3K TAK-1 active la signalisation NLK, aucune MAP2K physiologique de NLK n'a jusqu'à présent été caractérisée (78, 211, 212). Toutefois, la kinase HIPK2 phosphoryle NLK *in vitro* et *in vivo* (83). Il s'agit donc potentiellement d'une MAP2K pour NLK, cependant les mécanismes moléculaires de cette activation sont peu clairs. En effet, HIPK2 paraît pouvoir promouvoir l'autophosphorylation de NLK. De plus, plusieurs études rapportent que NLK est capable de s'autophosphoryler *in vitro* (76, 83). Les déterminants moléculaires de l'activation de NLK restent donc à déterminer.

#### **1.1.3.2.5 ERK7 (ERK8)**

La MAP Kinase atypique ERK7 représente un cas atypique dans la famille des MAPK. Bien que la protéine possède un motif TXY dans sa boucle d'activation, comme les MAP Kinases conventionnelles, il n'existe pas de MAP3K et de MAP2K connues qui régulent son

activité. En revanche, il semble que les résidus de sa boucle d'activation sont phosphorylés de manière constitutive, puisqu'aucun stimulus connu ne peut moduler cet état (75, 90). De plus la phosphorylation de la boucle d'activation de ERK7 semble être une autophosphorylation, puisque l'expression de mutants inactif ne permet pas de l'observer (75). De plus, la protéine ERK7 purifiée est capable de s'autophosphoryler *in vitro* (75, 164). L'extension C-terminale de ERK7 semble jouer un rôle déterminant dans son autophosphorylation (213).

De manière surprenante, si l'orthologue de ERK8 est elle aussi capable de s'autophosphoryler *in vitro*, sa phosphorylation semble être régulée *in vivo*, contrairement à ERK7. En effet, lorsque exprimée dans des cellules HEK293, la phosphorylation de la boucle d'activation de ERK8 est soumise à une compétition entre l'activité de ERK8 et celle de phosphatases (93). Ce mécanisme semble être régulé de manière dynamique, puisque des stimuli comme le stress oxydant ou un choc osmotique augmentent la phosphorylation de la boucle d'activation de ERK8. De plus, le sérum semble aussi promouvoir cette phosphorylation (164). Finalement, il semblerait que ERK8 puisse être sujet à phosphorylation sur la tyrosine de sa boucle d'activation par les kinases c-Src et v-Src, puisque l'expression ectopique de leur forme constitutivement active induit une augmentation de la détection de la forme phosphorylée de ERK8 (164).

Bien qu'il semble donc exister des différences dans la régulation de l'activation des homologues ERK7 et ERK8, il est encore à l'heure actuelle difficile de déterminer s'il s'agit de vraies différences apparues au cours de l'évolution ou si les connaissances de la régulation de ces enzymes sont encore trop peu développées pour en permettre une compréhension suffisante. Toutefois, le caractère majeur de cette activation, l'autophosphorylation des kinases, est conservée entre les espèces. A plus large échelle, cet aspect d'activation par autophosphorylation est retrouvé chez plusieurs MAP Kinases de différents règnes. Ainsi, en plus de ERK7, ERK8 et de l'activation non-canonique de p38 chez les mammifères, les MAP Kinases Smc1, exprimée chez *S. cerevisiae* et atMAPK9, présente chez la plante *A. thaliana*, sont capables de s'activer par autophosphorylation (214, 215). De manière intéressante, la phosphorylation de la boucle d'activation de Smc1 est contrôlée par un système hybride de transphosphorylation par une MAP2K et d'autophosphorylation, qui pourrait donc modéliser le mode de régulation de ERK8.

#### 1.1.3.2.6 ERK3 et ERK4

Comme démontré dans les chapitres précédents, lorsque on aborde la question de la régulation de l'activité des MAP Kinases, l'approche conventionnelle consiste en général à s'intéresser en premier lieu aux régulations de la phosphorylation de la boucle d'activation. Il est alors question d'identifier quelles sont les contextes biologiques qui modulent la phosphorylation de la boucle d'activation et quelles sont les kinases et phosphatases qui la contrôlent. C'est par ce genre d'approche qu'il a été établi que ERK1/2 sont des kinases activées par les facteurs de croissance et que p38 est activée par différents stress cellulaires. Dans le cas de ERK3 et ERK4, cette question est plus complexe. On sait depuis 1996 que ERK3 est phosphorylée sur la sérine 189 de sa boucle d'activation (111, 216). Il a aussi été démontré, plus récemment, que la sérine homologue 186 de ERK4 est phosphorylée *in vivo* (114). De plus, des travaux menés par Paul Déléris au sein de notre laboratoire visant à purifier et identifier l'activité kinase dirigée contre la Ser 186/189 de ERK3/4 ont permis d'identifier les kinases p21-activated kinases 1/2/3 (PAK1/2/3) (qui constitue les kinases PAK de groupe I) comme des kinases activatrices de ERK3/4 (217, 218). En revanche, contrairement aux MAP Kinase classiques, la phosphorylation de la boucle d'activation de ERK3/4 peut être détectée dans des cellules qui ne prolifèrent pas (« resting cells »). De plus, cette phosphorylation n'est modulée par aucun stimuli connus, qu'ils soient facteurs de croissance ou différents types de stress (114). Dans l'état actuel des connaissances, on considère donc que la phosphorylation de la boucle d'activation de ERK3 et ERK4 est constitutive. N'étant pas un phénomène dynamique, il apparaît donc que la phosphorylation de la boucle d'activation de ERK3 ne serait pas un moyen privilégié de réguler son activité biologique.

#### 1.1.3.3 Contrôle négatif de la phosphorylation des MAP Kinases par les phosphatases

La boucle d'activation de la plupart des MAP Kinases, est constituée du motif de double phosphorylation TXY. Pour que la kinase soit active, la thréonine et la tyrosine de ce

motif doivent donc être phosphorylée. En conséquence, les MAP Kinases sont sensibles à l'activité des sérine/thréonine phosphatases (PP), des tyrosines phosphatases (PTP) et des phosphatases à double spécificité DUSPs (dual specificity phosphatase).

Le terme de sérine/thréonine phosphatases décrit des complexes protéiques composés d'une sous-unité catalytique, de sous-unités régulatrices et parfois d'une composante chaperonne (exemple de la structure de l'holoenzyme PP2A (219)). Il existe approximativement une trentaine de sous-unités catalytiques, la diversité et la spécificité de substrats des PP leur est conférée par la diversité de leurs sous-unités régulatrices. On estime par exemple qu'il existe 26 sous-unités régulatrices différentes pour l'holoenzyme PP2A, chacune présentant un profil d'expression tissulaire différent (voir revue (220)). Il existe des preuves expérimentales que la phosphatase PP2A régule négativement la signalisation ERK1/2 *via* la déphosphorylation de MEK1/2 et ERK1/2 (221, 222). La signalisation p38 et JNK sont également la cible de régulation négative par PP2A et PP2C médiée par la déphosphorylation de MKK3/4/6 et p38 (223, 224). De plus l'inhibition des PP à l'aide de l'acide okadaïque, induit une prolongation dans le temps de la signalisation ERK1/2, p38 et ERK5 (204, 225, 226). Finalement la MAP Kinase atypique ERK8 est aussi déphosphorylée par la phosphatase PP2A *in vitro* et il semble qu'elle puisse être sujette à la réversion de la phosphorylation de la thréonine du motif TEY de sa boucle d'activation quand exprimée dans des cellules HEK293 (93).

Les tyrosine phosphatases (PTP) sont séparées en 4 familles qui recouvrent une centaine de gènes chez l'humain (227). Parmi les PTP qui régulent les voies MAP Kinases, PTP-SL et STEP (STriatal-Enriched protein tyrosine Phosphatase) régulent négativement la voie ERK1/2 en modifiant le résidu phosphotyrosine de leur boucle d'activation (228). De plus, les protéines p38 $\alpha$  et ERK5 sont elles aussi modulées par les tyrosines phosphatases (229, 230).

Finalement, les phosphatases qui semblent les plus importantes pour la régulation des MAP Kinases sont membres d'un sous-groupe au sein de la famille des phosphatases à double spécificité (DUSP), et sont appelées « MAPK phosphatases » (MKP). Chez les mammifères il existe 10 MKPs organisée en trois groupes selon leur spécificité de substrats et leur caractéristiques structurales. Des efforts importants de recherche ont été consacrés à déterminer la spécificité de substrats de ces phosphatases, résumés au tableau I.

Les MKPs possèdent un domaine catalytique conservée dans leur partie C-terminale. Le domaine N-terminal des MKPs comporte un motif d'interaction KIM (pour « Kinase Interaction Motif ») avec les MAP Kinases (231, 232). Les séquences KIM lient les domaines CD et ED des MAP Kinases (232, 233). Toutefois, la littérature récente, notamment les études de structures montrent que si ce motif est nécessaire à l'interaction, la liaison phosphatase/MAP Kinase est plus complexe et diverge entre les différentes MKPs (234-237). De plus si certaines MKPs nécessitent d'être phosphorylée pour être activée, c'est le cas notamment de MKP-3 qui est activée par ERK2, d'autres semblent être constitutivement actives (238, 239).

**Tableau I. Résumé de la spécificité de substrat des MAP Kinases phosphatases.**

	Spécificité
DUSP1/MKP1	ERK1/2, JNK/p38 (240, 241)
DUSP2	ERK1/2, p38 (242) (243)
DUSP4/MKP-2	ERK1/2, JNK/p38 (244)
DUSP5	ERK1/2 (239)
DUSP6/MKP-3	ERK1/2 (245)
DUSP7/MKP-X	ERK1/2 (246)
DUSP9/MKP-4	ERK1/2 (247)
DUSP8	JNK/p38 (245) (234)
DUSP10/MKP-5	JNK/p38 (234)
DUSP16/MKP-7	JNK/p38 (234)

Les MKPs sont importantes pour le contrôle spatial et temporel de la signalisation par les MAP Kinases. Ainsi, les phosphatases MKP-3 et DUSP5, ciblant toutes deux ERK1/2, sont localisées respectivement dans le cytoplasme et le noyau grâce à la présence de NES (nuclear export signal) et de NLS (nuclear localization signal) (239, 248). Elles peuvent donc réguler différenciellement la signalisation ERK1/2. De plus, les kinases ERK1/2 sont déphosphorylées

très rapidement en réponse à leur activation par les facteurs de croissance (249). Les MKPs sont donc en partie responsable du contrôle du caractère transitoire de la signalisation.

#### **1.1.3.4 Contrôle de la localisation cellulaire**

Le contrôle de la localisation des MAP Kinases conventionnelles est important pour leur fonction puisque cette dernière peut déterminer la réponse cellulaire induite par l'activation de ces voies. Ainsi la localisation des modules RAF/MEK/ERK en réponse à différents stimuli est une des causes déterminantes entre une activation courte ou soutenue de ERK1/2 (250). D'une manière similaire, la kinase p38 n'est pas localisé identiquement quand activée par sa MAP2K ou par sa voie non-canonique, et n'induit pas les mêmes réponses cellulaires (251).

Il existe des caractéristiques communes pour toutes les MAP Kinases conventionnelles. Ainsi, en réponse à leur activation, une partie de la fraction cytoplasmique des kinases ERK1/2, p38, JNK et ERK5 est relocalisée au noyau. En l'absence de stimulation les kinases ERK1/2, ERK5 et JNK sont situées dans le cytoplasme, alors que les différentes isoformes de p38 sont présentes à la fois dans le noyau et le cytoplasme (200, 240, 252, 253).

Le mécanisme de la translocation nucléaire en réponse à l'activation est caractérisé pour les MAP Kinases ERK1/2. En absence de signal mitogénique, ERK1/2 interagissent avec MEK1/2 qui contient un signal d'export nucléaire et séquestre donc ERK1/2 dans le cytoplasme (254). En réponse à leur stimulation, les protéines ERK et MEK sont phosphorylées sur un signal de translocation nucléaire qui induit leur interaction avec l'importine 7 et leur transfert vers le noyau (255). Dans le cas de ERK1/2 cette phosphorylation est médiée en partie par la caséine kinase 2 (CK2) (256).

Les mécanismes de relocalisation nucléaire des autres MAP Kinases conventionnelles sont moins caractérisés. Néanmoins, il est établi que la kinase ERK5 possède un signal de localisation nucléaire dans sa région C-terminale (64). Cette même région semble aussi contenir un signal d'export nucléaire (257). La localisation de ERK5 est donc le résultat de la compétition entre ces deux régulations contraires (258). De plus, il a été démontré que les différentes isoformes des MAP Kinases JNK et p38 peuvent être transloquées au noyau grâce à un système dépendant des importines 3/7/9, similaire à celui décrit pour ERK1/2 (259). Toutefois, les régulations de ces relocalisations en fonction des stimuli d'activation ne sont pas

encore caractérisées, comme c'est le cas pour ERK1/2. Finalement, la localisation de p38 semble être modulée par son substrat MK2, de la même façon que ce qui est observé pour ERK3 avec MK5 ((260) et paragraphe suivant).

Contrairement aux MAP Kinases classiques, ERK3 et ERK4 semblent être dans un état actif constitutif. En conséquence, leur localisation de ERK3 et ERK4 dans des cellules non stimulées correspond à la localisation de leur forme active. La dynamique de localisation diffère entre les deux kinases. Ainsi ERK3 se retrouve dans le cytoplasme et le noyau d'une grande variété de types cellulaires, tandis que ERK4 est principalement cytoplasmique (106, 117, 135). La localisation cytoplasmique de ERK3 nécessite un système de transport actif dépendant de CRM1, pour lequel l'extension C-terminale de ERK3 est nécessaire (135). Au contraire des MAP Kinases classiques, la localisation cellulaire de ERK3 et ERK4 ne change pas en réponse à un stimulus connu. En revanche, la localisation de ERK3 semble varier au cours du cycle cellulaire, même si les études qui décrivent ce phénomène semblent conflictuelles. Ainsi, une première étude rapportait que dans des cellules HeLa ERK3 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi lors de la mitose (105), tandis qu'une seconde décrit, dans le même modèle ERK3 comme étant répartie de manière homogène dans la cellule au cours de la mitose (261). En revanche les auteurs des deux études s'accordent sur une localisation nucléaire de ERK3 à l'interphase dans ce type cellulaire. Finalement, de manière comparable à ce qui est observé pour p38 et MK2, l'interaction entre ERK3 et son substrat MK5 (voir 2.2.3.3) induit la redistribution cytoplasmique des deux protéines (115, 116). Les conséquences fonctionnelles de cette relocalisation, ainsi que les stimuli physiologiques ou pathologiques qui la module sont à ce jour inconnus.

#### **1.1.3.5 Régulation de l'activité de MAP Kinases : conclusions**

Si la régulation de l'activité biologique des MAP Kinases est traditionnellement confondue avec la phosphorylation de leur boucle d'activation, l'ensemble des études présentées dans ce chapitre montre qu'il existe plusieurs modes de régulation additionnels. Ces aspects sont toutefois moins caractérisés : la régulation de l'expression et de l'abondance protéique des

MAP Kinases est par exemple très peu étudiée. Ce dernier point est particulièrement intéressant pour la protéine ERK3, puisque la phosphorylation de sa boucle d'activation semble être peu régulée. De plus, on sait depuis presque 15 ans maintenant que la protéine ERK3 est sujette à une régulation de son expression protéique par le système ubiquitine-protéasome (134). Cette régulation est donc potentiellement particulièrement importante pour le contrôle de l'activité de ERK3, comparativement aux autres MAP Kinases. Le chapitre suivant a donc pour but de présenter le fonctionnement du système ubiquitine-protéasome, afin de mieux comprendre comment il peut réguler l'activité de ERK3.

## **1.2 Le système ubiquitine-protéasome**

### **1.2.1 Un système de maintien de l'homéostasie protéique à deux composantes**

Le contrôle du contenu protéique des cellules, ou homéostasie protéique, implique une régulation de la production mais aussi de l'élimination des protéines. Le système ubiquitine-protéasome (UPS pour Ubiquitin-Proteasome System) a pour fonction de réguler cette dernière. Le système peut être découpé en deux composantes distinctes. D'une part, le protéasome, est un complexe enzymatique composé de sous-unités multiples. Comme son nom l'indique, l'activité enzymatique de ce complexe catalyse la lyse protéolytique. D'autre part, les multiples enzymes qui constituent la machinerie d'ubiquitination régulent la liaison covalente de molécules d'ubiquitine sur des substrats protéiques. Le UPS participe à de nombreuses fonctions dans la cellule. Il a pour rôle d'assurer le « contrôle-qualité » des protéines de la cellule en contrôlant la dégradation des protéines mal conformées ou endommagées (voir revue (262)). De plus, en régulant la stabilité et donc l'expression de nombreuses protéines, il est impliqué dans pratiquement l'ensemble des fonctions cellulaires.



### 1.2.2 L'histoire du système ubiquitine protéasome

La découverte d'une activité protéolytique non-lysosomale dépendante de l'ATP a été identifiée pour la première fois dans des réticulocytes en 1977 (263). Jusqu'à cette découverte, il était communément admis que la plupart des protéines intracellulaire existaient de manière stable dans la cellule. La notion d'activité protéolytique intracellulaire existe pourtant depuis le début du XXème siècle (264). De plus, la balance entre synthèse et dégradation pour conserver un équilibre protéique avait déjà été démontrée (265). En revanche, la pensée dominante était que la dégradation était dépendante de l'activité des lysosomes, et qu'il s'agissait d'un processus peu élaboré destiné uniquement aux protéines mal conformées. Un an après ces premiers travaux d'identification, une étude publiée par Avram Hershko et son étudiant Aaron Ciechanover identifie un complexe multimérique responsable de cette activité protéolytique (266). Deux composantes, appelées APF-I et APF-II pour « ATP-dependent proteolysis factor 1 et 2 » sont isolées. En collaboration avec le laboratoire de Irwin Rose, ils montrent ensuite qu'il existe une fraction 2-a et 2-b pour le facteur multiprotéique APF-2, puis qu'une ou plusieurs molécules de APF-1 peuvent se lier de manière covalente aux protéines dans un processus ATP-dépendant (267, 268). Ils suggèrent alors que l'addition de APF-1 sur une protéine sert de signal de dégradation pour une protéase (267). Parallèlement à ces travaux fondateurs, en 1980, le groupe de Arthur L. Haas identifie le facteur APF-I (269). Il s'agit d'une protéine dont on sait peu de choses à l'époque, si ce n'est qu'elle semble exister de manière universelle, ubiquitaire, et qui s'appelle donc l'ubiquitine (270). Les groupes de Hershko, Ciechanover et Rose identifient ensuite les E1, E2 et E3 (271-273). Ils décrivent aussi le processus de polyubiquitination et identifient l'activité déubiquitinase (267). Il aura suffi de seulement 6 ans à 3 groupes de recherche pour identifier toutes les composantes du UPS ! Pour ces études d'identification et de caractérisation du UPS, qui poseront la base de tout un domaine de recherche, ces trois scientifiques se verront décerner le prix Nobel de Chimie en 2004.

Les décennies suivantes seront consacrées à l'identification des fonctions biologiques du UPS. Deux études majeures du groupe de Alexander Varshavsky vont paver la voie, en établissant les premières preuves de dégradation protéique dépendantes de l'ubiquitine *in vivo*

et en démontrant que le UPS est nécessaire à la viabilité cellulaire (274, 275). L'idée que le contrôle de la dégradation protéique est un processus cellulaire important commence alors à voir le jour. Les nombreuses études subséquentes permettront de déterminer que le UPS est nécessaire à de nombreuses fonctions de la vie eucaryotes, notamment dans la division cellulaire, la réparation de l'ADN et le contrôle de l'expression génique (voire revues (276, 277)).

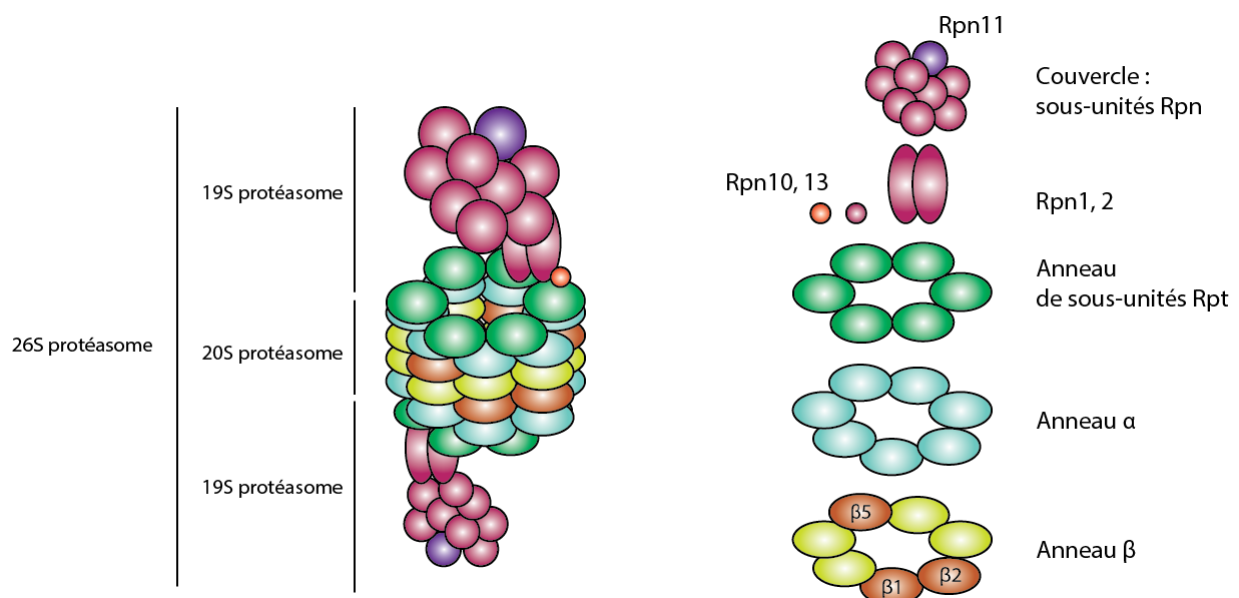
La dernière grande étape dans l'étude du UPS survient à la fin des années 2000, alors que l'on en connaît déjà bien les régulations et le rôle. Les avancées technologiques permettent d'observer l'ubiquitination et la dégradation de l'ensemble des protéines de la cellule (278-282). Toutefois, il n'existe que peu d'informations quantitatives sur la stabilité du protéome. De plus, les différentes approches utilisées génèrent des résultats difficiles à concilier les uns aux autres. Ainsi, plusieurs études, utilisant soit marquage métabolique de type « pulse » ou une technique de fluorescence de type « bleach-chase », rapportent une demi-vie médiane allant de 9 à 46 heures pour les protéines humaines (283-285). Chez la levure toutefois, les études rapportent des valeurs médianes de demi-vie variant entre 8.8 et 10 heures (286, 287). La plupart de ces études démontrent pourtant, dans des expériences de validations de leurs méthodes, de bons taux de corrélation avec la méthode classique de cycloheximide-chase en western blot (280, 284). Les études qui sont certainement les plus complètes sur le sujet ont été développées par le groupe de recherche de Stephen J Elledge, qui a mis au point un système qui ne quantifie pas la demi-vie directement mais mesure un indice de stabilité protéique. Il s'agit du système GPS pour « global protein stability » (278). Cette technique, basée sur le sous-clonage de banque de cDNA dans des vecteurs permettant l'expression de protéines de fusion avec un marqueur fluorescent, a permis de déterminer des indices de stabilité protéique (PSI pour « protein stability index »). Cette approche, combinée avec les études à grande échelle de conjugaison à l'ubiquitine par spectrométrie de masse, permet de mieux comprendre le fonctionnement du UPS à l'échelle d'un système.

### **1.2.3 Le protéasome**

Le protéasome – ou 26S protéasome - est la composante du système qui catalyse la dégradation des substrats protéiques. Il s'agit d'un complexe de 2,5 MDa composé de multiples sous-unités organisées en deux sous-ensembles : le 20S protéasome, responsable de l'activité catalytique, et le 19S protéasome, à activité régulatrice. La notion de protéasome est apparue pour la première fois en 1988 (288), mais la présence d'un grand complexe multiprotéique en forme d'anneau à activité protéolytique existait depuis quelques années déjà (289, 290). Le 26S protéasome semble être restreint au domaine eucaryote, toutefois il existe une forme de 20S protéasome chez les archées (ou archéobactéries) (291, 292). Chez les eucaryotes, le protéasome est localisé à la fois dans le noyau et le cytoplasme (293).

### 1.2.3.1 Structure et activité

Le 26S protéasome est constitué d'une structure 20S à laquelle sont associées une ou deux structures 19S. Le 20S protéasome est une structure cylindrique creuse à l'intérieur de laquelle les substrats sont dégradés. A chaque extrémité de ce tube sont liées deux structures formant « couvercle » : le 19S protéasome. Cette sous-unité régulatrice est responsable de contrôler l'entrée des substrats dans la cavité catalytique.



**Figure 7. Le 26S protéasome.**

Adapté de (294).

### **1.2.3.2 20S protéasome**

Les études de cristallographie réalisée chez la levure et les mammifères montrent que le 20S protéasome a une structure de tonneau creux, constituée de quatre anneaux, eux-mêmes formés chacun de sept sous-unités, empilés les uns sur les autres (295, 296). Ces sous-unités sont de deux types :  $\alpha$  et  $\beta$ . Les anneaux sont formés de sept sous-unités  $\alpha$  ou sept sous-unités  $\beta$  et assemblés selon la configuration  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$  (figure 7). La partie centrale, composée des anneaux  $\beta$  est responsable de l'activité catalytique. Les sous-unités  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_5$  ont en effet une activité protéolytique respectivement de type caspase, trypsine et chymotrypsine. Il existe une variante du protéasome, appelée immunoprotéasome, où ces sous-unités sont remplacées par les protéines LMP2, LMP7 et MECL-1 (aussi appelées sous-unités  $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{2i}$  et  $\beta_{5i}$ ). Le complexe formé présente une activité catalytique plus orientée contre les résidus basiques et hydrophobes qui semble plus favorable à la production de peptides utilisés par le système de présentation des antigènes (297, 298). Les deux anneaux  $\alpha$  constituent les « entrées » de la cavité catalytique et ne possèdent pas d'activité catalytique. Chez les eucaryotes, lorsque le 20S protéasome n'est pas lié au 19S, les extrémités N-terminales des sous-unités  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  et  $\alpha_4$  interagissent entre-elles, bloquant ainsi l'entrée des substrats. La liaison du 19S protéasome, par son interaction avec les sous-unités des anneaux  $\alpha$ , modifie la structure de cette entrée qui passe en conformation « ouverte » (299, 300). Il semblerait donc que le 20S protéasome ne peut fonctionner en l'absence d'une sous-unité régulatrice. La plus caractérisée est le 19S protéasome, mais il convient cependant de noter qu'il existe d'autres régulateurs, qui sont ATP-indépendants : le complexe régulateur 11S (connu aussi sous le nom de PA28) et le complexe Bln10/PA200 dont l'interaction avec les anneaux  $\alpha$  est elle aussi capable de modifier la structure du 20S protéasome pour permettre l'entrée des substrats protéiques (301, 302). Leurs fonctions biologiques sont toutefois peu claires, il semblerait néanmoins que le 11S protéasome soit associé à la production de peptides immunogènes par l'immunoprotéasome

(303). La structure régulant la dégradation de substrats ubiquitinés par le 20S protéasome est donc le complexe 19S.

### **1.2.3.3 19S protéasome**

Il n'existe à l'heure actuelle pas de structure du 19S protéasome obtenue par cristallographie. Toutefois, plusieurs études publiées en 2012, utilisant notamment la cryo-microscopie électronique et la cristallographie des différentes sous-unités, ont permis de déterminer un modèle structural pour le 26S protéasome, et donc pour la partie régulatrice 19S (304-307). Ce dernier est composé de 19 sous-unités qui forment une structure d'approximativement 900 kDa organisée en deux sous-ensembles communément appelés la base et le couvercle (308) (Figure 7). La base est composée de : six sous-unités à activité ATP-ases, nommées Rpt1-6 pour « Regulatory Particle aTp-ase 1-6 » organisées en forme d'anneau (309) ; deux sous-unités possédant des domaines de liaison à l'ubiquitine Rpn10 et Rpn13 (Regulatory Particle Non-ATP-ase) ; et deux grosses sous-unités structurales Rpn1 et Rpn2. Le couvercle est composé de huit sous-unités structurales Rpn3, 5-9, 12 et 15 et de la sous-unité à activité déubiquitinase Rpn11. (Voir revue (310)).

En plus de ces 19 sous-unités originalement décrites comme le squelette du 19S protéasome, il existe plusieurs protéines qui interagissent avec le complexe de manière plus ou moins transitoire. Parmi ces protéines on trouve des déubiquitinases, des récepteurs d'ubiquitine, des ubiquitines ligases et des chaperonnes nécessaires à l'assemblage (voir revue (311)). Il faut aussi noter le cas de la protéine « Deleted In Split Hand/Split Foot Protein 1 » (DSS1) qui lie les substrats protéiques ubiquitinés et semble être un des composants stœchiométriques de la structure (312).

Le 19S protéasome est essentiel au traitement des substrats ubiquitinés par le 26S. Le processus implique la reconnaissance du substrat, sa dénaturation, sa translocation vers le 20S et sa déubiquitination. Le rôle joué par chacune des sous-unités dans ces différents processus a été caractérisé par de nombreuses études fonctionnelles. Parmi les sous-unités nécessaires à la reconnaissance des substrats poly-ubiquitinés, se trouvent les sous-unités qui possèdent les domaines de liaison à l'ubiquitine Rpn10 et 13, ainsi que DSS1 (313-315). La protéine de

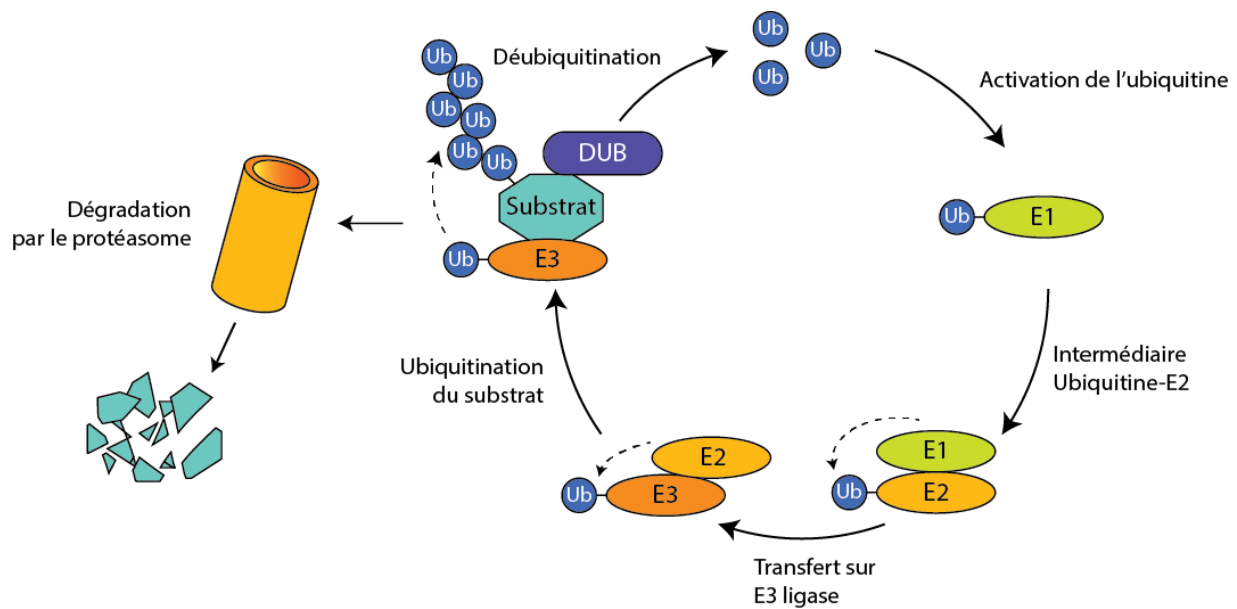
structure de la base Rpn1 semble aussi pouvoir jouer ce rôle (316). De plus, il existe aussi des protéines associées au 19S qui jouent ce rôle, notamment la protéine Rad23 (317). La dénaturation et la translocation du substrat semblent être dépendantes de l'activité des ATPases Rpt1-6 (318, 319). Le fonctionnement de ces dernières n'est toutefois pas entièrement compris. Finalement, le 19S a une fonction déubiquitineuse, nécessaire pour que les substrats puissent être traités par le 20S, mais aussi au recyclage de l'ubiquitine. La sous-unité Rpn11 a une activité métalloprotéase catalysant la déubiquitination de substrats (320). De plus, Rpn1 et Rpn13 recrutent des déubiquitinasés nommées respectivement USP14 et UCH37/UHL5 (321, 322).

Les études récentes de structure ont permis de commencer à clarifier la dynamique de l'ensemble du protéasome lors des différentes étapes de traitement des substrats. On pensait jusqu'à cette date que la base du 19S était au contact du 20S et que le couvercle était placé de manière à obstruer le canal formé par l'anneau de sous-unité ATPases. Il semblerait en fait que les sous-unités de la base Rpn10 et 13 soient positionnées en périphérie du 19S (323). Cette configuration permet d'exposer les domaines récepteurs à l'ubiquitine sur les deux protéines. De plus, la position des sous-unités ATPases semble dynamique passant d'une conformation favorisant l'engagement du substrat ubiquitiné à une conformation induisant sa translocation vers le 20S protéasome (voir (324)).

#### **1.2.4 La machinerie d'ubiquitination**

Le terme ubiquitination décrit un processus de modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout par liaison covalente d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine sur un substrat. Dans le cas de la dégradation des protéines c'est l'ubiquitination qui permet d'adresser les substrats au protéasome. Le processus d'ubiquitination est la somme de plusieurs réactions enzymatiques impliquant diverses classes de protéines. La première de ces réactions, l'activation de l'ubiquitine, est dépendante de l'ATP et est catalysée par l'enzyme d'activation E1. L'ubiquitine est ensuite transférée sur une enzyme de conjugaison, ou conjugase, E2. La dernière étape est une réaction de transfert sur le substrat protéique, par la formation d'une liaison isopeptidique sur une lysine dans la plupart des cas, catalysée par les

ubiquitine ligases E3. Cette dernière classe d'enzyme est très diversifiée, il existe par approximativement 700 E3 ligases dans le génome humain. En conséquence, les mécanismes moléculaires de transfert de l'ubiquitine au substrat peuvent varier : certaines E3 fonctionnent comme un récepteur permettant le transfert direct de l'ubiquitine de la conjugase au substrat, d'autres forment un intermédiaire en liant directement l'ubiquitine et la transfèrent ensuite sur le substrat. Néanmoins, quel qu'en soit le mode de fonctionnement, les E3 sont responsables de la reconnaissance du substrat et donc de la spécificité de signal. Les déubiquitinases (DUB) sont des enzymes qui clivent les liaisons de l'ubiquitine et dont la fonction s'oppose donc aux complexes E2/E3. L'ubiquitination est virtuellement impliquée dans l'ensemble des fonctions cellulaires. En conséquence une inhibition de l'ensemble du système, par la répression de l'expression de l'enzyme E1, induit l'arrêt du cycle et la mort cellulaire (325-327).



**Figure 8. Le processus d'ubiquitination.**

Schéma simplifié du processus d'ubiquitination, avec l'exemple d'une E3 ligase de type HECT.

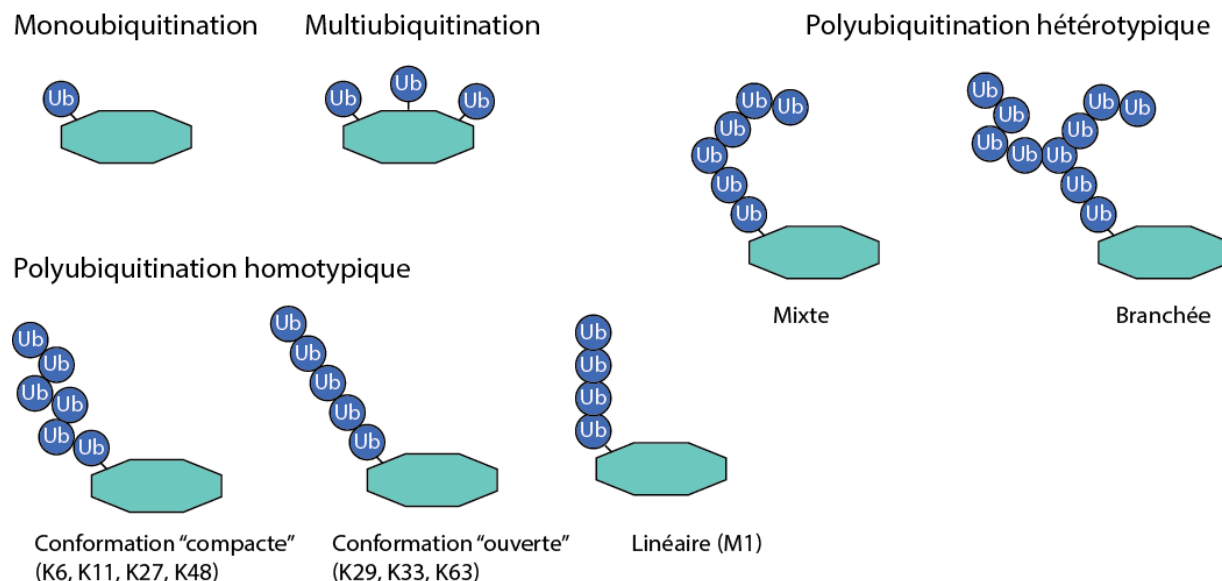
#### 1.2.4.1 L'ubiquitination : une modification pour des messages distincts de signalisation cellulaire

De par la diversité des enzymes qui la régle, l'ubiquitination est un processus qui peut prendre plusieurs formes. Les différents types d'ubiquitination peuvent promouvoir différentes issues allant de la promotion de l'activité d'une enzyme au trafic intracellulaire d'un récepteur membranaire, en passant évidemment par la dégradation de substrats.

#### **1.2.4.2 Différentes types d'ubiquitination**

Lors de la réaction d'ubiquitination, une molécule d'ubiquitine est attachée de manière covalente à son substrat, dans la plupart des cas sur une lysine interne, par son extrémité C-terminale. Les protéines peuvent être modifiées par une seule molécule d'ubiquitine, dans le processus de monoubiquitination. Ce processus peut être multiple, si la protéine est monoubiquitinée sur plusieurs résidus. Dans d'autres cas, des polymères d'ubiquitine sont liés au substrat protéique, il s'agit alors d'une polyubiquitination. Ces polymères sont formés par la liaison entre le C-terminal d'une molécule d'ubiquitine sur une des 7 lysines internes (K6, K11, K27, K29, K33, K48 ou K63) ou sur l'extrémité N-terminale libre (appelée liaison M1) d'une autre molécule d'ubiquitine. Il existe plusieurs types de chaînes de polyubiquitine : des chaînes homotypiques, qui sont formées par un seul type de liaison, des chaînes hétérotypiques, où plusieurs types de liaisons cohabitent, et finalement des chaînes dites « branchées », où une molécule d'ubiquitine est conjuguée sur plusieurs de ses résidus (voir figure 9).





**Figure 9. Différents types d'ubiquitination**

Il existe un niveau supplémentaire de complexité : il existe des chaînes dites « mixtes » qui sont composées d'ubiquitine et de molécules associées à l'ubiquitine (voir revue (328)). Un des exemples les plus connus est l'addition de molécules d'ubiquitine sur des chaînes polySUMO par l'ubiquitine ligase RNF4 pour contrôler la dégradation de la protéine « promyelocytic leukemia » (PML) (329, 330).

Les différents types de chaînes de polyubiquitine sont associées à différents mécanismes moléculaires de régulation pour les protéines ciblées. Au niveau structurel, certaines liaisons produisent des chaînes à conformation compacte (liaison K6, K11, K27, K48) et d'autres des chaînes à conformation ouverte ou linéaire (liaison K29, K33, K63, M1). La conformation de ces chaînes détermine leur interaction avec leurs différents partenaires d'interactions et définissent donc leur fonctions (voir revue (331)).

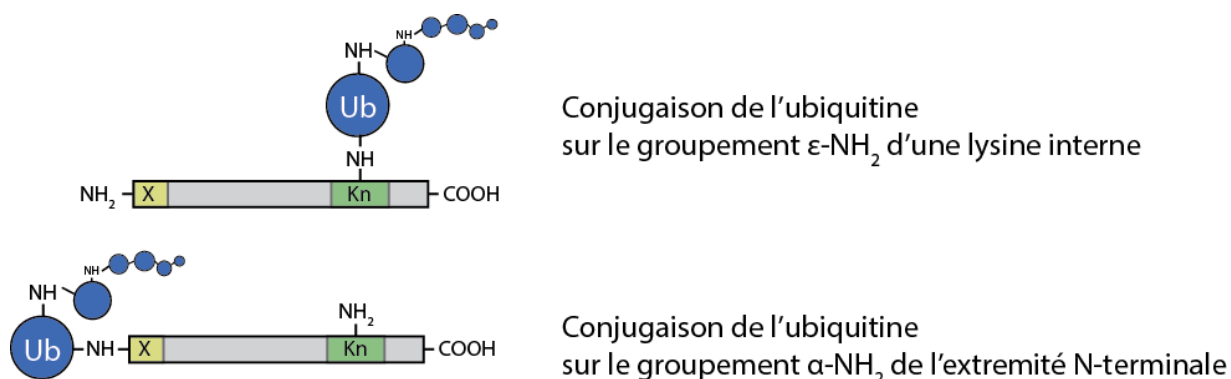
Pendant longtemps, les chaînes de type K48 et K63 ont été quasiment les seules à être étudiées. Les **chaînes de polyubiquitine K48** ont un rôle essentiel dans la dégradation des substrats par le protéasome. Cette fonction est la première à avoir été découverte pour le

processus d'ubiquitination (332). Il existe de nombreuses ubiquitines ligases qui peuvent catalyser la formation de chaînes de polyubiquitine K48, il s'agit en conséquence du type de chaîne le plus présent dans la cellule (280). **Les chaînes de type K63** sont quant à elles des messagers de signalisation cellulaire. Elles peuvent moduler une grande diversité de fonctions, allant de la régulation des interactions protéiques à la régulation de la localisation intracellulaire d'un substrat. Ses rôles les plus décrits sont sans doute dans le domaine de la réparation des dommages à l'ADN et le trafic intracellulaire de récepteurs membranaires (voir revues (333, 334)).

Les autres types de chaînes de polyubiquitine, dites chaînes « atypiques », sont moins caractérisées et leurs rôles cellulaires moins définis. **Les liaisons de type K6**, sont certainement les moins connues de toutes. Elles ne semblent pas jouer de rôle dans la dégradation de substrats par le protéasome et sont associées à la réponse aux dommages à l'ADN car il a été démontré que l'ubiquitine ligase BRCA1/BARD1, un acteur majeur de la réparation de l'ADN, catalyse préférentiellement l'assemblage de chaînes de polyubiquitine de type K6 (335). De la même façon, les **liaisons de type K27** semblent avoir un rôle important dans la réparation des dommages à l'ADN. En effet, il a été montré que l'histone H2A est conjugué à des chaînes polyubiquitine K27, ce qui permet le recrutement de facteurs essentiels de réparation de l'ADN comme 53BP1, Rap80, RNF168 et RNF169 (336). **Les liaisons de type K29 et K33** ont été démontrées pour réguler négativement l'activité de plusieurs voies de signalisation cellulaire, notamment de la signalisation Wnt et celle induite par le récepteur aux cellules T (337, 338). La formation de chaînes de polyubiquitine linéaire générées par **les liaisons de type M1** sont quant à elle des régulateurs de l'inflammation et de l'immunité innée. Le principal acteur de cette forme de polyubiquitination est le complexe LUBAC (pour « linear ubiquitin chain assembly complex ») dont l'activité aboutit à l'activation de la signalisation NF- $\kappa$ B (339, 340). Finalement, **les chaînes d'ubiquitine de type K11** semblent réguler elles aussi la dégradation de substrats protéiques par le protéasome. Ces dernières représentent un cas intéressant où les chaînes homotypiques ne semblent pas induire le même effet que les chaînes hétérotypiques. En effet, les chaînes K11 sont un signal de dégradation modéré qui lie faiblement le protéasome, tandis que les chaînes mixtes K11/K48 représentent un signal de dégradation fort (341, 342).

### 1.2.4.3 Un cas atypique d'ubiquitination : l'ubiquitination N-terminale

L'ubiquitination est en général décrite comme la conjugaison d'une ubiquitine sur la lysine interne d'un substrat. Cependant, il existe d'autres formes d'ubiquitination, parmi lesquelles l'ubiquitination N-terminale, qui consiste en l'ajout d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine sur le groupement amine de l'extrémité du substrat.



**Figure 10. L'ubiquitination N-terminale**

Comparaison schématique de l'ubiquitination interne et de l'ubiquitination N-terminale, faisant apparaître les liaisons isopeptidiques entre l'ubiquitine et la lysine interne d'un substrat et les liaisons peptidiques entre l'ubiquitine et l'extrémité N-terminale d'un substrat.

Il existe une dizaine de substrats dont la littérature suggère qu'ils sont ubiquitinés en N-terminal. La plupart des preuves de l'ubiquitination N-terminale sont toutefois indirectes. Ainsi, il a été démontré que la mutation des lysines internes des protéines p21 ou MyoD n'affectent pas leur ubiquitination et leur dégradation par le protéasome, pointant vers le groupement  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> du N-terminal comme seule site possible pour la conjugaison de l'ubiquitine (343, 344). D'autre part, il a été démontré que la présence d'un épitope en N-terminal ou la délétion de l'extrémité N-terminale stabilise les protéines « human papillomavirus 16 (HPV 16) oncoprotein E7 », « latent membrane protein 1 » (LMP1),

LMP2A, et « inhibitor of differentiation 2 » (Id2) (298, 345-348). Pour d'autres substrats potentiels de l'ubiquitination N-terminale, il existe des preuves directes de conjugaison de l'ubiquitine au N-terminal, obtenue par des expériences d'ubiquitination *in vitro* et détectées par spectrométrie de masse. C'est le cas de la protéine virale E7, de la protéine apparentée à l'ubiquitine SUMO, de la protéine ATAXIN-3 et de la conjugase UBE2W, qui semble donc pouvoir s'auto-ubiquitiner (349-352). Finalement, une étude publiée dans notre laboratoire par Philippe Coulombe démontre l'existence d'un fragment peptidique constitué d'une molécule d'ubiquitine liée à la protéine ERK3 exprimée de manière exogène dans des cellules en culture (353). Il s'agit de la seule preuve directe d'ubiquitination N-terminale *in vivo* publiée à ce jour.

Bien que découverte il y a presque 20 ans, le fonctionnement de l'ubiquitination N-terminale était entièrement incompris jusqu'à tout récemment. Des études récentes ont toutefois démontré que la conjugase UBE2W catalyse la liaison d'une molécule ubiquitine sur l'extrémité N-terminale de certains substrats *in vitro* (349, 350). Cette particularité semble être causée par un domaine catalytique UBC non-conventionnel. En effet, la plupart des enzymes E2 ont une asparagine conservée en amont de leur site actif qui semble être impliquée dans la stabilisation d'un intermédiaire de la formation du lien isopeptidique avec la lysine du substrat (354). La protéine UBE2W contient une histidine à cette position, qui est essentielle pour son activité catalytique dirigée contre l'extrémité N-terminale des substrats (351). De plus, la partie C-terminale de la protéine permet de lier directement certains substrats *in vitro*. En conséquence, bien que la présence d'une ubiquitine ligase augmente la cinétique de la réaction, UBE2W peut catalyser la monoubiquitination N-terminale de substrats sans la présence de E3 (351). Une chaîne de polyubiquitine peut ensuite être formée à partir de cette monoubiquitination grâce à l'action d'autres enzymes conjugases (349, 355). La spécificité de substrat de UBE2W semble être guidée par une région N-terminale non structurée (351). Les E3 ligases spécifiquement associées à ce processus ne sont pas connues, mais les études de UBE2W ont fait apparaître que RNF4 et le complexe BRCA1/BARD1 peuvent collaborer à l'ubiquitination N-terminale catalysée par UBE2W (349, 351). Malgré ces avancées récentes dans la compréhension du mécanisme moléculaire d'ubiquitination N-terminale par ces études *in vitro*, la pertinence biologique du processus reste mal comprise. Ainsi la protéine UBE2W

ne semble pas essentielle pour la prolifération cellulaire (356). En revanche, des souris mutantes n'exprimant pas UBE2W présentent un phénotype de susceptibilité à la mortalité néonatale et de défauts de développement du système reproducteur male et de la peau (357). Le rôle global de l'ubiquitination N-terminale est donc toujours mal compris.

#### **1.2.4.5 L'enzyme d'activation E1**

Chez la plupart des eucaryotes il est en général considéré qu'il n'existe qu'une seule enzyme d'activation E1, encodée par le gène *Uba1* (Ubiquitin Like Modifier Activating Enzyme 1). Ainsi l'inactivation de ce gène chez la levure (327, 358), la drosophile (326), ou l'humain (275) bloque presque totalement l'ubiquitination des protéines. Contrairement aux enzymes E1 des molécules similaires à l'ubiquitine telles que Nedd8 ou SUMO qui fonctionnent sous la forme d'hétérodimère, l'enzyme UBA1 est un monomère de 120 kDa (359). Cette dernière est organisée en 4 parties : Les deux domaines d'adénylation qui lient l'ATP et l'ubiquitine ; insérés dans ces domaines se trouvent deux demi-domaines qui ensemble forment le domaine catalytique ; un assemblage de quatre hélices elles aussi insérées dans un des domaines d'adénylation ; un domaine nommé « ubiquitin-fold domain » (UFD) situé dans la partie C-terminal de la protéine. Ce domaine UFD est, en collaboration avec le domaine catalytique, responsable du recrutement des enzymes E2 et du transfert de l'ubiquitine vers ces dernières (360).

Le processus d'activation de l'ubiquitine par UBA1 est un processus en plusieurs étapes. En premier lieu, l'enzyme lie une molécule d'ATP, l'ubiquitine et catalyse l'acyl-adénylation de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine. Dans un deuxième temps, l'ubiquitine est transférée sur la cystéine catalytique de UBA1, générant un thioester. L'enzyme E1 lie ensuite une nouvelle molécule d'ubiquitine qui est elle aussi acyl-adénylée. Finalement, l'ubiquitine liée à la cystéine est transférée à la conjugase E2 par une réaction de transthoestérification. Cette dernière réaction est rendue possible par une rotation du domaine UFD qui met en proximité les cystéines actives des enzymes E1 et E2 (360).

Bien qu'il soit communément admis que la protéine UBA1 soit la seule E1, la notion d'enzyme d'activation unique est toutefois contestable. En effet, il existe une autre enzyme avec une activité de type E1, la protéine UBA6 (361, 362). Toutefois, celle-ci semble fonctionner uniquement avec une enzyme conjuguase spécifique appelée « Uba6-specific E2 » (Use1). Cette voie d'ubiquitination parallèle est beaucoup moins caractérisée, néanmoins elle participe à la dégradation des protéines par la règle du N-terminal (363). De plus, les souris déficientes pour le gène *Uba6* meurent avant le jour 5 de l'embryogenèse, preuve de l'importance de l'ubiquitination dépendante de UBA6 *in vivo* (362). Les seuls substrats caractérisés de la voie UBA6/USE1 à l'heure actuelle sont l'ubiquitine ligase E6AP et les substrats de la règle du N-terminal RGS4/5 (Regulator of G-protein Signaling proteins) (363, 364).

#### **1.2.4.6 Les conjuguases de l'ubiquitine E2**

Les conjuguases E2 sont les intermédiaires entre l'étape d'activation par l'enzyme E1 et l'ubiquitination du substrat protéique. Elles catalysent, dans la plupart des cas, une réaction de transthioylation ou d'aminolyse en fonction qu'elles transfèrent l'ubiquitine sur un groupe thiol d'une cystéine sur une E3 ligase (une étape intermédiaire de l'ubiquitination finale d'un substrat) ou sur le groupement amine d'une lysine ou de l'extrémité N-terminale d'un substrat. Dans des cas plus rares, certaines E2 peuvent catalyser une réaction d'estérification menant à la formation d'une liaison oxyester entre une ubiquitine et les résidus sérine ou thréonine d'un substrat (voir revue (365)).

Si la conception usuelle de la cascade d'ubiquitination confère à l'ubiquitine ligase E3 le rôle de reconnaissance du substrat, de plus en plus de preuves expérimentales montrent que les E2 peuvent directement lier et ubiquitiner certaines de leur protéines cibles et participent donc à la reconnaissance du substrat. C'est le cas notamment des conjuguases UBCH5A/B/C (366, 367), mais aussi de UBE2W qui reconnaît les régions N-terminales non structurées des substrats et catalyse la formation d'un lien peptidique entre le groupement amine de cette extrémité et l'ubiquitine, sans que la présence d'une ligase soit nécessaire (351). Cette

spécificité de fonction se trouve aussi au niveau des substrats de type ubiquitine. Ainsi les conjugases UBE2G1 ou UBE2K peuvent catalyser l'apparition de chaînes de poly-ubiquitine K48, même en l'absence d'une enzyme E3 (368, 369). D'autres conjugases comme le complexe UBE2N/UBE2V1/2 ou la protéine UBE2S semblent spécialisées pour former des chaînes d'ubiquitine de type K63 ou K11 respectivement (370-372).

Ce rôle des enzymes E2 dans la diversité de l'ubiquitination explique certainement qu'il existe un peu plus de 40 enzymes E2 chez l'humain, impliquées dans le transfert de l'ubiquitine ou des molécules associées. Toutes ces protéines contiennent un domaine catalytique d'approximativement 150 acides aminés, appelé UBC pour « ubiquitin conjugating domain », qui contient la poche catalytique, des domaines de liaisons respectifs pour les enzymes E1/E3 et une surface de liaison pour des interactions protéines/protéines au dos de la poche catalytique. L'analyse des interactions E2:E3 et E2:E1 montre que les sites de liaisons se chevauchent et qu'il y a donc une compétition entre les deux interactions (373). De plus, la comparaison des interactions entre le domaine UBC et les ligases de type HECT ou RING montre qu'il existe un motif commun de liaison reconnu par les deux familles (374).

De part et d'autre de leur domaine UBC, la majorité des conjugases E2 possèdent des extensions N- et C-terminales qui participent à la régulation de la fonction des protéines. Par exemple, l'extension N-terminale des conjugases UBE2E1/2/3 limite la processivité des enzymes : les protéines pleines longuent leurs substrats, tandis que les domaines UBC seuls catalysent la formation de chaînes de poly-ubiquitine sur ces mêmes substrats (375).

Les conjugases E2 sont la cible de régulations qui contrôlent leur spécificité ou leur activité. Le premier de ces mécanismes est la modulation de la processivité des enzymes E2 par des liaisons non covalentes au niveau du dos de leur poche catalytique. Dans la plupart des cas, cette interaction non covalente se fait avec une molécule d'ubiquitine, qu'elle soit libre ou elle-même conjuguée par une liaison thioesther sur une autre conjugase E2 (377). Cette association moléculaire a été démontrée augmenter la processivité de nombreuses enzymes E2, notamment UBCH5a/b/c (377, 378), la conjugase K11 spécifique UBE2B (379), et la SUMO conjugase UBE2I (380). En revanche, la protéine UBE2E3 (aussi connue sous le nom de UBCH9) semble être régulée de manière contraire. Les interactions au niveau du dos de sa

poche catalytique inhibent sa processivité, et restreignent en conséquence son activité à la monoubiquitination de substrats (381). Finalement ces interactions moléculaires non-covalentes peuvent se faire avec les ligases E3. Les conséquences de ces interactions peuvent être variables suivant les couples E2/E3. D'une part, en compétitionnant avec l'ubiquitine pour la liaison à la E2, la protéine E3 peut diminuer la processivité du complexe. C'est le cas notamment de la liaison Rad18/UBE2B, qui en inhibant l'interaction UBE2B/ubiquitine promeut la monoubiquitination des substrats du complexe Rad18/UBE2B (379, 382). Il s'agit alors d'un mode de régulation qualitatif de l'activité du complexe E2/E3. Alternativement, l'interaction non-covalente entre la conjugase et la ligase peut augmenter l'activité de l'enzyme E2. C'est le cas par exemple de l'interaction entre l'enzyme E3 gp78 et la protéine UBE2G2 (383). Finalement, cette interaction semble pouvoir dans certains cas promouvoir la liaison de la ligase avec une enzyme E2 liée à l'ubiquitine, au dépend d'une forme « non chargée » (383, 384). Ce mode de régulation permettrait donc d'augmenter la processivité du système en favorisant l'échange rapide d'une nouvelle enzyme chargée en ubiquitine pour remplacer celle « non chargée » après le transfert au substrat. Ce dernier mécanisme est particulièrement intéressant dans la mesure où des travaux du groupe de Ray Deshaies ont montré que la dynamique rapide d'assemblage/désassemblage des complexes E2/E3 est essentielle à la processivité des ubiquitines liges de type RING (385).

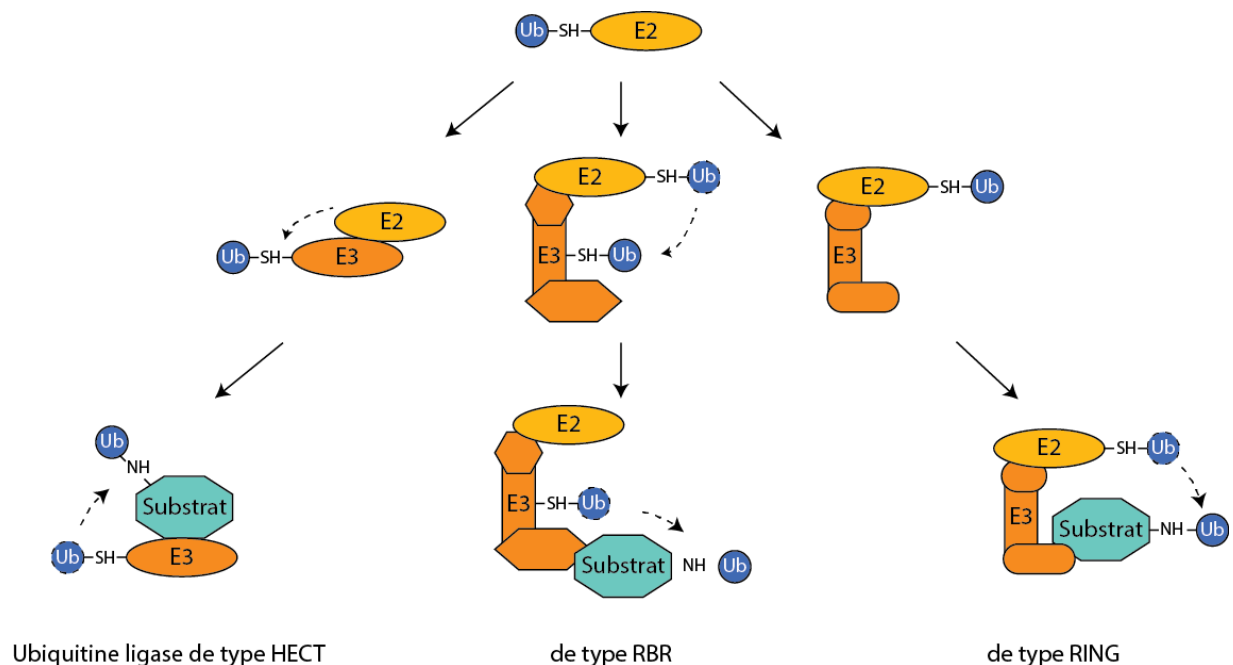
Les conjugases sont aussi la cible d'autres types de régulations, notamment de modifications post-traductionnelles. Ainsi les enzymes E2 peuvent elles-mêmes être ubiquitinées, selon deux processus distincts. D'une part, comme toute autre protéine, la conjugase peut être ubiquitinée sur une lysine interne. Ainsi, la conjugase UBE2T peut s'auto-mono-ubiquitiner sur des lysine internes, diminuant ainsi son activité catalytique (386). D'autre part, les enzymes E2 peuvent être la cible d'un mode d'ubiquitination plus original, puisque restreint aux protéines formant un lien thioester avec l'ubiquitine. En effet, la conjugase UBE2G2, ainsi que son homologue fongique Ubc9, peut être la cible d'un processus de polyubiquitination reposant sur l'ubiquitine liée à la cystéine de son site actif, induisant sa dégradation par le protéasome (387, 388). Finalement, les enzymes E2 peuvent, comme toutes les protéines, être la cible de processus de phosphorylations. Des études rapportent la présence de ce type de modifications post-traductionnelles sur les extrémités N-



et C-terminales (389), aussi bien que dans le domaine UBC (390). Bien que rapporté individuellement pour peu d'enzyme, la phosphorylation dans le domaine catalytique, proche de la poche catalytique, semble être un mécanisme commun d'activation des enzymes E2 (391).

#### **1.2.4.7 Les ligases de l'ubiquitine E3**

Les ubiquitines ligases sont les enzymes qui lient les conjuguées E2 ainsi que le substrat. Elles sont responsables de la dernière étape du processus d'ubiquitination. Il existe approximativement 700 E3 ligases connues dans le protéome humain, réparties en trois familles : les ligases de type RING, de type HECT (homologous to the E6AP carboxyl terminus) et un troisième groupe hybride de type RING-between-RINGS (RBR). Selon la classe à laquelle elles appartiennent, les différentes ligases ont un fonctionnement complètement différent (voir figure 11). Ainsi les ligases HECT ont une activité enzymatique qui catalyse le transfert de l'ubiquitine d'une liaison thioester à une cystéine de leur site actif à une liaison isopeptidique sur une lysine interne de leur substrat. En revanche, les ligases de type RING ne semblent pas avoir d'activité enzymatique mais servent comme molécules d'échafaudage, mettant en contact le substrat et la conjuguée E2 qui transfère alors directement l'ubiquitine. Finalement, les ligases de type RBR sont des hybrides avec des caractéristiques d'enzyme RING mais qui contiennent aussi un site actif capable de former un intermédiaire thioester avec une molécule d'ubiquitine. De par leur nombre et leur disparité, on estime que les ubiquitine ligases sont les principales responsables de la diversité de substrat et de fonction du processus d'ubiquitination.



**Figure 11. Le fonctionnement des différents types de ligases de l'ubiquitine.**

#### 1.2.4.7.1 de type HECT

Les ubiquitines ligases de type HECT sont nommées ainsi car elles possèdent un domaine actif homonyme dans leur partie C-terminale. Ce domaine présente, comme son nom « homologous to the E6AP carboxyl terminus » l'indique, une similarité de structure avec l'enzyme E3 E6AP (392). Il contient une cystéine conservée au niveau de son site actif, qui forme un lien thioesther avec une ubiquitine et permet de catalyser la dernière étape de la chaîne d'ubiquitination (393). Le domaine HECT est composé de deux structures : le lobe N-terminal, qui comprend le site de liaison aux enzymes E2, et le lobe C-terminal, responsable de l'activité catalytique de la protéine. Les deux régions sont séparées par une région flexible agissant comme une charnière. Cette région est importante dans le changement de conformation du domaine HECT en réponse à la liaison d'une enzyme E2 conjuguée à une ubiquitine, qui permet de réduire la distance entre les sites actifs des deux enzymes et donc de rendre possible la réaction de transthoestérification (394).

La famille des enzymes E3 de type HECT représente la première famille d'ubiquitine ligases identifiée il y a un peu plus de vingt ans. Il existe approximativement 30 ubiquitine

ligases de type HECT dans le génome humain, qui peuvent être réparties en trois groupes par similarités structurelles : le groupe des ligases de type Nedd4, qui contiennent des domaines WW dans leur structure ; le groupe des enzymes HERC qui, comme leur nom « HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase » l'indique, contiennent un ou des domaines RLD (RCC1-Like Domains) en plus de leur domaine catalytique HECT ; finalement un groupe d'une dizaine de membre regroupant les ligases de type HECT n'ayant ni domaine WW, ni domaine RLD. Les différents domaines présents dans les régions N-terminales régulent les interactions protéines-protéines et confèrent donc la spécificité de substrats aux ubiquitine ligases de type HECT.

Une des questions dans le champ d'étude de l'ubiquitination qui reste sans réponse à l'heure actuelle est celle de l'association fonctionnelle entre les conjuguases et les ligases à l'échelle des systèmes. Ainsi, il n'existe pas de portrait global permettant de savoir quelle enzymes E2 fonctionnent préférentiellement avec quelles classes d'enzymes E3. On sait néanmoins que les ubiquitines ligase de type HECT sont principalement décrites pour s'associer aux enzymes UBE2L3 (UBCH7) et UBE2D1/2/3 (UBCH5a/b/c), mais semblent pouvoir fonctionner avec d'autres conjuguases (395). De plus, il semblerait que la spécificité des réactions de polyubiquitination soit intrinsèque au domaine HECT et ne dépende pas de l'association avec une conjugase (396, 397). Cette spécificité dans la polyubiquitination semble du reste varier entre les différents ubiquitine ligases de type HECT. Ainsi, l'enzyme E6AP catalyse principalement des chaînes de polyubiquitine de type K48, tandis que les ligases de la sous-famille Nedd4 forment préférentiellement des chaînes de type K63 (mais de manière non exclusive) (398, 399).

A cause de cette diversité de structure et de fonction catalytique, les enzymes de types HECT régulent un grand nombre de fonctions cellulaires. Il serait donc vain de tenter d'en dresser une liste. Toutefois, les fonctions de la ligase E6AP, une enzyme particulièrement importante pour ce travail de thèse, sont abordées dans les chapitres de résultats.

#### 1.2.4.7.2 de type RING

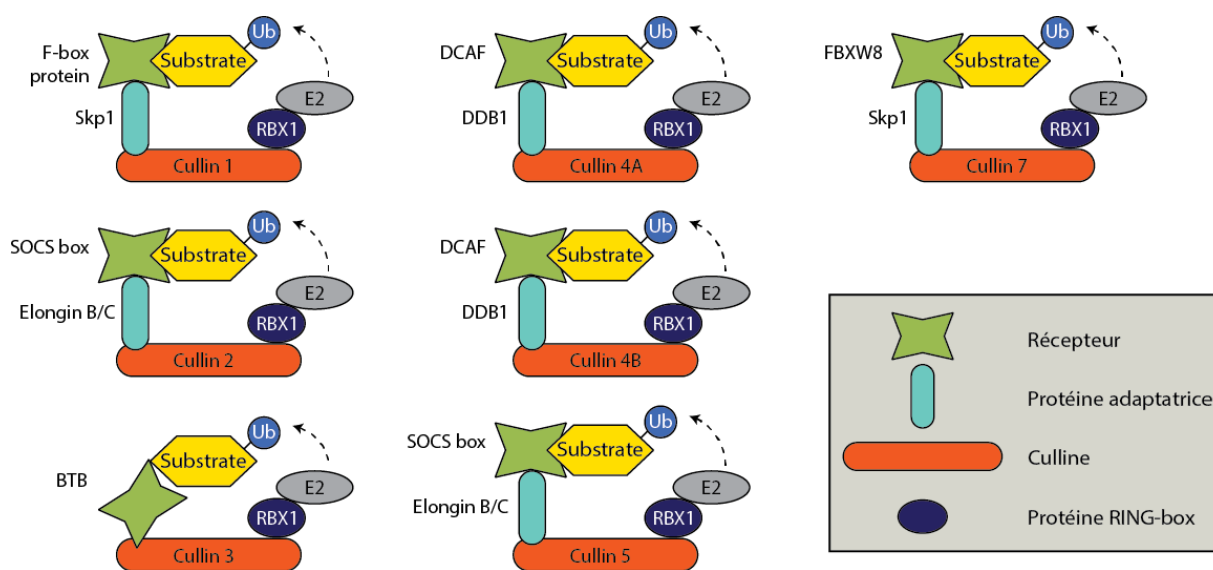
Le groupe des ubiquitines ligases de type RING regroupe les enzymes qui possèdent le domaine éponyme, ou un domaine apparenté, tel que le domaine « U-box » ou « plant homeodomain ». Il s'agit du groupe qui regroupe la très grande majorité des ubiquitines ligases, avec approximativement 600 membres chez *H. sapiens* (400). Le domaine RING est une structure en forme de croisillon, organisée autour de deux ions Zinc. Chacun d'entre eux est coordonné par quatre résidus histidine et cystéine. Les domaines apparentés U-box ne sont pas organisés autour de ces structures de « doigts de zinc », mais des interactions internes entre acides aminés leur confèrent une structure tridimensionnelle comparable à celle des domaines RING (401). De plus, il existe des protéines procaryotes qui possèdent des domaines sans homologie de séquence aux domaines RING, mais dont la structure tridimensionnelle est semblable et qui possède une activité ligase de l'ubiquitine (402, 403). Il existe donc plusieurs stratégies pour développer une structure avec les caractéristiques d'un domaine RING.

La fonction de ces différents domaines est la liaison avec le domaine UBC des ubiquitine conjuguases (404). Comme pour les enzymes de type HECT, il semble que les ligases de type RING peuvent lier plusieurs conjuguases. Ainsi, l'ubiquitine ligase formée par le complexe BRCA1/BARD1 peut s'associer avec 10 enzymes E2 différentes (405). Cette diversité de liaison peut sans doute s'expliquer par le fait que les interactions RING:E2 sont de faibles affinités et que les complexes E3(RING):E2 peuvent s'assembler et se désassembler avec une forte cinétique (385). Ce dynamisme des interactions rend les approches classiques de purification par affinité difficilement utilisables pour identifier des couples fonctionnels E2:RING E3. En revanche, l'approche de crible double hybride semble permettre d'obtenir des informations d'interactions pertinentes à grande échelle pour ce genre de complexe (406, 407). Toutefois, il n'existe que peu d'informations sur les associations E2:RING à l'échelle des systèmes, à l'instar de ce qui est observé pour les ligases de type HECT.

Le fonctionnement des ubiquitines ligases de type RING est complètement différent de celui des enzymes HECT. Au contraire de ces dernières, les E3 de type RING ne possèdent pas de site catalytique. Elles fonctionnent comme un activateur allostérique de l'activité enzymatique des conjuguases envers un substrat protéique. De par leur fonction non-

catalytique, la spécificité de fonctions des ligases de type RING est donc plus dépendante des enzymes E2 que celle des enzymes de type HECT. Par exemple, la ligase RNF4, quand associée à la conjugase RAD6B induit la monoubiquitination de substrat, tandis qu'associée à UBCH5B en promeut la polyubiquitination (408).

Les nombreux membres de la grande famille des ubiquitines ligases de type RING représentent une diversité structurale et fonctionnelle importante. Ainsi certaines E3 ligase de type RING sont monomériques, tandis que d'autres sont formés par des complexes multimériques comportant de nombreuses sous-unités. Il serait donc vain de vouloir dresser un portrait global de cette famille d'enzymes. Néanmoins, il existe un sous-groupe qui représente la plus grande classe connue d'ubiquitine ligase, qui ont des rôles centraux dans de nombreuses fonctions cellulaires. Il s'agit de la famille des « Cullin ring ubiquitin-ligases » (CRL), qui sont des complexes modulaires dont la diversité de composition permet de former un nombre très élevé de ligases fonctionnelles (figure 12).



**Figure 12. Les différents complexes CRL.**

Tous les complexes CRL sont structurés autour d'un membre de la famille des cullines, qui donne leur nom au différents complexes (voir figure 12). Ils comportent de plus une protéine de type RING-box, dans la plupart des cas « RING-box protein 1 » (RBX1), dont la

fonction est de recruter la conjugase E2 au complexe (409, 410) ; une protéine adaptatrice spécifique à chaque type de culline ; une protéine réceptrice qui détermine la spécificité de substrat. La nomenclature communément admise pour un complexe CRL indique quelle culline et quelle protéine réceptrice forme le complexe. Ainsi, le complexe  $CRL1^{\beta-TrCP}$  est constitué de la culline 1 et de la sous-unité récepteur  $\beta-TrCP$ . Il convient de noter que cette nomenclature coexiste avec des abréviations plus anciennes spécifiques aux complexes CRL, comme par exemple la terminologie SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) qui désigne en général les complexes CRL1.

Les complexes CRL sont l'objet de plusieurs régulations, dont l'une existe pour l'ensemble des membres du groupe. Il s'agit de la conjugaison de la petite protéine NEDD8 (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 8) dans la région C-terminale des cullines (411). Ce processus, appelé NEDDylation, est nécessaire à l'activité des complexes CRL en modulant leur conformation spatiale et le recrutement des enzymes E2 (412, 413). De manière intéressante, l'inhibition de l'enzyme d'activation de la NEDDylation par une petite molécule, appelée MLN-4924, induit une inhibition des complexes CRL (414). Il s'agit d'une stratégie utilisée pour étudier les substrats de ces complexes à grande échelle (281).

Il existe aussi des cas d'inhibition chimique directe des complexes CRL. Un exemple récent de la littérature est la thalidomide, une molécule sédatrice prescrite aux femmes enceintes dans les années 1950 et induisant des effets tératogènes (415). Il a récemment été démontré que ses effets sur l'embryogenèse étaient dus à l'inhibition du complexe  $CRL4^{CRBN}$  (416). De manière intéressante, la thalidomide semble être un modulateur sélectif de la fonction des complexes  $CRL4^{CRBN}$ , diminuant l'affinité pour certains substrats et augmentant l'affinité du complexe pour d'autres (417).

De par le nombre élevé de complexes CRL existants, il n'est pas surprenant de constater que leur fonction est nécessaire à de nombreux processus cellulaires importants. Ainsi, une étude à l'échelle du protéome des substrats des complexes CRL indique que ces derniers sont impliqués dans une grande diversité de fonctions, mais aussi que les substrats

régulés par plusieurs complexes CRL distincts sont souvent des gènes qualifiés d'essentiels (279, 281).

#### **1.2.4.7.3 de type RBR**

Il existe finalement un dernier type de ligases de l'ubiquitine appelées ligase de type RBR, pour « ring between ring fingers ». Il s'agit d'un type hybride d'enzyme, partageant certaines caractéristiques des enzymes HECT et RING, qui a été identifiée ces dernières années. Elles comportent un ensemble catalytique conservé, composé d'un domaine RING1, suivi d'un domaine « in-between RING » (IBR) et d'un domaine RING2 (418). Les ubiquitines ligases de type RBR utilisent un mécanisme moléculaire hybride entre les ligases de type HECT et RING (figure 11). Les enzymes de type RBR initient le contact avec les conjuguées E2 à l'aide de leur domaine RING1, mais, d'une manière similaire aux ligases HECT, il y a formation d'un intermédiaire de liaison à l'ubiquitine par une liaison thioesther (419, 420).

Il existe une douzaine de ligase de type RBR chez l'humain, dont certains sont mieux caractérisés. Il s'agit entre autres de « Heme-Oxidized IRP2 Ubiquitin Ligase 1 » (HOIL1) et de « HOIL-1-Interacting Protein » (HOIP), deux membres du complexe LUBAC, une holoenzyme qui catalyse la formation de chaînes de polyubiquitine linéaires et qui contrôle notamment la réponse à l'inflammation et l'immunité innée (339, 419, 420). L'ubiquitine ligase PARKIN, une enzyme dont les mutations sont associées à la maladie de Parkinson, est un autre membre bien étudié de la famille RBR (421, 422). Bien que ses fonctions cellulaires soient de plus en plus comprises, notamment son rôle important dans la biologie des mitochondries, le lien entre le rôle de la protéine et la maladie de Parkinson reste à l'heure actuelle peu caractérisé (423, 424).

La régulation des ubiquitines ligases de type RBR est caractérisée par le contrôle de leur activité enzymatique par auto-inhibition. Ce mécanisme a été décrit pour les composantes du complexe LUBAC ou pour la ligase PARKIN (419, 420, 425, 426).

#### 1.2.4.8 Les déubiquitinases

L'ubiquitination des protéines est un processus réversible. Les enzymes responsables de cette réversion de l'ubiquitination sont les déubiquitinases. La superfamille des déubiquitinases est composée d'une centaine de protéine, regroupées en cinq familles (tableau 2), distinguées par leur domaine catalytique. La famille qui compte le plus de membres est celle des « ubiquitin-specific proteases » (USPs), suivie des « ovarian tumour proteases » (OTUs), des « JAB1/MPN/MOV34 metalloenzymes » (JAMMs), des « ubiquitin C-terminal hydrolases » (UCHs) et finalement de la famille des « Josephins ». Toutes sont des enzymes de type cystéine protéases, à l'exception des JAMMs qui sont des métalloprotéases dépendantes du Zinc.

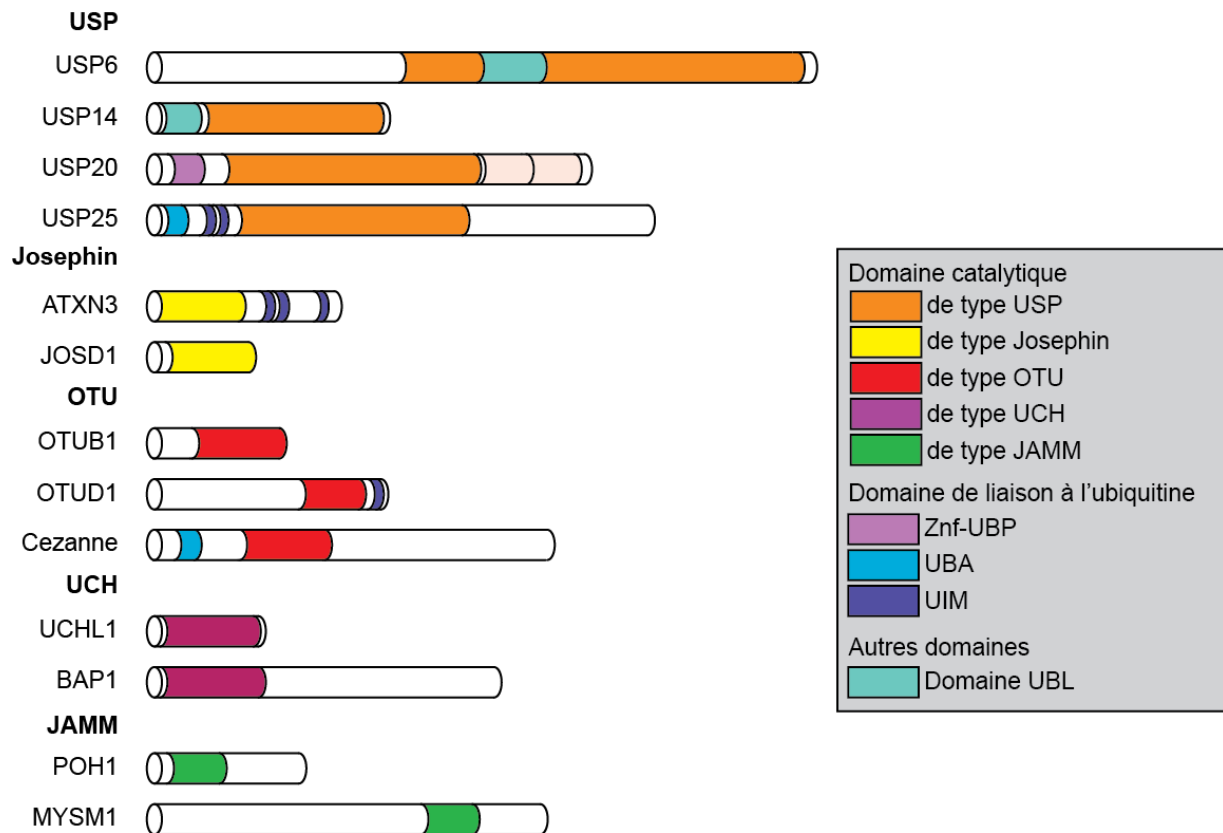
**Tableau II. Les différentes familles de déubiquitinases.**  
(Adapté de 435).

<b>Famille</b>	<b>Membres</b>
USP	57
OTU	16
JAMM	12
UCH	4
Josephin	4
<b>Total</b>	<b>93</b>

La très grande majorité des DUB possède un domaine de liaison à l'ubiquitine, qu'il soit de type « zinc finger ubiquitin-specific protease domain » (ZnF-UBP), « ubiquitin-interacting motif » (UIM) ou un domaine de type UBA (figure 13). L'organisation structurale des différentes DUB varie fortement au sein d'une même famille. Ainsi, parmi les membres de la famille USP, on trouve par exemple des protéines comme USP14 dont le domaine catalytique est composé de 378 acides aminés et certaines comme USP6 pour laquelle ce



même domaine fait 837 acides aminés et contient un domaine de liaison à l'ubiquitine de type UBL (voir figure 13). De la même façon, il existe au sein des familles USP et OTU des protéines possédant une grande variété de combinaison des domaines ZnF-UBP, UIM ou UBA.



**Figure 13. Diversité structurelle des déubiquitinases.**  
Exemples représentatifs démontrant la diversité au sein des différentes familles de déubiquitinases.

La plupart des DUB catalysent le clivage de la liaison isopeptidique entre le groupement amine d'une lysine et l'extrémité carboxyterminale d'une molécule d'ubiquitine. Il existe toutefois des exceptions notables, comme les membres UCH-L3 et UCH-L5 de la famille des UCH qui, s'ils peuvent être actifs contre les liaisons isopeptidique, clivent préférentiellement les liaisons peptidiques formées entre une molécule d'ubiquitine et

l'extrémité N-terminale d'un substrat protéique (427, 428). Il existe une spécificité pour l'activité des déubiquitinasés, qui dépend principalement de deux facteurs : la spécificité pour le type de chaînes de polyubiquitine et la spécificité pour le substrat. La spécificité des DUB est un mélange plus ou moins pondéré de ces deux facteurs. Ainsi, l'enzyme USP14 dégrade uniquement les chaînes de type K48, en clivant les ubiquitines les plus distales une à une (429). À l'inverse la déubiquitinase CYLD clive des chaînes de polyubiquitine à liaison K63, en clivant des portions entières de chaîne (430, 431). La spécificité de toutes les DUB n'est pas connue, bien que des efforts aient été déployés pour tenter d'en dresser un portrait le plus global possible (432-434).

Au vu de la diversité de rôle des processus d'ubiquitination (voir chapitres précédents), il est logique de constater que les DUB jouent des rôles très variés dans la cellule (voir revue (435)). Toutefois, il convient de signaler trois rôles pour les DUB, qui sont intimement liés à leur spécificité pour les chaînes de polyubiquitine. Le premier de ces rôles est la régulation de la stabilité des substrats protéiques. Il existe de nombreux exemples dans la littérature de DUB qui contrecarrent l'action d'ubiquitine ligases en déubiquitinant, et donc en stabilisant, un substrat. C'est par exemple le cas de l'enzyme USP20, qui sera abordée plus en détail dans les chapitres suivants de cette thèse, qui stabilise le facteur de réponse à l'hypoxie HIF1 $\alpha$  ou la kinase CHK1 (436, 437). Le deuxième des rôles des DUB est la régulation négative d'événements de signalisation cellulaire contrôlés par l'ubiquitination. Les enzymes qui accomplissent cette fonction ont bien souvent une activité de clivage dirigée contre les chaînes K63 ou pour la monoubiquitination. C'est le cas par exemple de l'enzyme USP33, qui oppose l'action de l'ubiquitine ligase Mdm2 sur le trafic intracellulaire des RCPG en déubiquitinant la protéine  $\beta$ Arrestine (438). Finalement, les DUB jouent un rôle dans le recyclage de l'ubiquitine au protéasome (439). Grâce à ce mécanisme, lorsque le substrat protéique est dégradé, les DUB liées au protéasome clivent les chaînes d'ubiquitine, libérant des molécules qui peuvent être réutilisées par la machinerie E1/E2/E3. Les enzymes UCH-L5 (UCH37) et USP14 sont décrites pour jouer ce rôle (321, 429).

### **1.2.5 Régulations des voies de signalisations MAP Kinases par le système ubiquitine-protéasome**

Depuis leur découverte, la régulation des signalisations MAP Kinases a été extensivement étudiée. De manière surprenante, si beaucoup de travaux se sont concentrés sur la régulation de leur phosphorylation et autres processus d'activation, il n'existe que très peu de données dans la littérature sur le contrôle de la stabilité et de l'abondance protéique des MAP Kinases. De plus, il n'existe pas, à notre connaissance, de synthèse des quelques mécanismes connus du contrôle de la stabilité des MAP Kinases. Le chapitre suivant a donc pour but de rassembler les informations connues sur la régulation de la stabilité des MAP Kinases, afin de mettre en contexte la régulation de ERK3. Pour chaque signalisation MAP Kinase, nous avons rassemblés les données de la littérature sur la stabilité des MAP3K, MAP2K et MAPK.

#### **1.2.5.1 Signalisation ERK1/2**

La signalisation ERK1/2 est contrôlée au niveau de l'abondance protéique à plusieurs niveaux. De manière intéressante, toutes les kinases du module des MAP3K semblent être des protéines dont la stabilité est régulée.

Les trois isoformes de la kinases RAF, A-Raf, B-Raf et C-Raf (ou RAF-1), sont les MAP3K activatrices canoniques de la voie MEK/ERK. Parmi les molécules régulatrices de la fonction de ces kinases, la protéine chaperonne Hsp90, bien connue pour son rôle dans la stabilisation de ses substrats, contrôle l'abondance des isoformes C-Raf et A-Raf. En effet une inhibition chimique de Hsp90 résulte en diminution de la demi-vie de C-Raf et A-Raf, qui se traduit par une diminution de leur expression protéique (440-443). Une étude récente suggère que Hsp90 est un régulateur de l'autophosphorylation de C-Raf sur sa sérine 621 (444). Or, il a déjà été démontré que la phosphorylation de ce résidu, conjugué à la liaison de protéines échafauds 14-3-3 subséquente, est importante pour réguler la demi-vie de la protéine (444,

445). En effet, la protéine non-phosphorylée semble être reconnue par le système ubiquitine-protéasome comme une protéine mal conformée (445). Cette forme de la protéine est donc dégradée en partie par le système de reconnaissance CHIP, mais il est nécessaire de noter qu'il semblerait qu'il existe une autre composante (445).

L'isoforme B-Raf de la protéine, sous sa forme sauvage, n'interagit pas avec Hsp90. De manière surprenante, sa forme oncogénique mutée V600E, qui est constitutivement active, est quant à elle une protéine instable, avec une demi-vie significativement plus courte (441, 446). De la même façon que les isoformes A-Raf et C-Raf, B-Raf V600E interagit avec Hsp90 et l'inhibition de cette dernière induit l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome de B-Raf V600E (441, 446). Le mécanisme de cette dépendance à Hsp90 semble toutefois être différent de celui observé pour C-Raf. En effet, la sérine 729 de B-Raf (analogue de la sérine 621 de C-Raf) serait phosphorylée par la « AMP-activated protein kinase » (AMPK), induisant une modification de partenaires protéiques, mais ne modifiant pas l'expression protéique ou la stabilité de la protéine (447). Si les mécanismes de sa dépendance à Hsp90 ne sont pas entièrement compris, il semblerait toutefois que B-Raf V600E partage certaines caractéristiques des protéines clientes de Hsp90. En effet, l'ubiquitination et l'expression protéique de B-Raf V600E semble être régulée par le complexe CRL à Culline 5, propriété quelle partage avec plusieurs protéines kinases dépendantes de Hsp90 (448). Il apparaît de plus que plusieurs protéines portant des mutations oncogéniques telles que v-src, c-KIT ou p53 sont dépendantes de Hsp90, comparativement aux protéines sauvages (449-451).

La protéine B-Raf sauvage est indépendante de Hsp90, mais semble être elle aussi l'objet d'une régulation de son activité par sa stabilité. En effet, sous certaines conditions il apparaît que la protéine peut devenir instable, notamment dans le cas d'un traitement de lignées de cellules issues de carcinomes colorectaux avec la simvastatine. Dans ces conditions, l'ubiquitination et la dégradation de la protéine semblent être dépendante de la E3 ligase RNF149 (452). Toutefois, il convient de noter que les études s'intéressant à la dépendance de RAF V600E à Hsp90 rapportent que la forme sauvage de la protéine semble stable (441, 446). Une des raisons de la discordance des rapports sur la stabilité de la protéine B-Raf sauvage pourrait se trouver dans le niveau d'activité de la voie MAPK. En effet, il semble exister une boucle de rétro-inhibition qui contrôle l'activité de la voie MAPK au niveau de la stabilité de la protéine B-Raf. Chez le nématode *C. Elegans*, l'homologue de B-Raf, LIN-45, est un

substrat de l'ubiquitine ligase SEL-10, homologue de FBXW7 (453). Ce processus, menant à la dégradation de LIN-45, est dépendant de l'activité des homologues de MEK et ERK (453). Cette boucle de rétro-inhibition a aussi été observée dans des cellules de mammifères, mais dans ce contexte elle semble indépendante du complexe SCF<sup>FBXW7</sup> (454). Dans cette étude, les auteurs ont déterminé que l'expression de la forme mutée B-Raf V600E induit une diminution de la demi-vie de B-Raf WT. L'identité de la machinerie d'ubiquitination reste à découvrir, toutefois les auteurs ont pu déterminer que la déstabilisation de B-Raf dépend de sa phosphorylation par les kinases ERK (454). Il apparaît donc que la forme active de B-Raf induit la déstabilisation de la protéine par des mécanismes moléculaires indirects. La dépendance de B-Raf V600E à Hsp90 pourrait donc s'expliquer à la fois par la modification de sa structure mais aussi par les voies de signalisation qu'elle active.

Les régulations d'abondance protéique de A-Raf, C-Raf et B-Raf V600E sont particulièrement intéressante d'un point de vue thérapeutique, au regard de l'importance de ces protéines dans la carcinogenèse. Par exemple, on estime que plus de 50% des mélanomes présentent une mutation de B-Raf, dont 80% sont la substitution V600E (455). Des inhibiteurs de B-Raf ont ainsi été développés et utilisés en étude cliniques pour de nombreux types de cancers, notamment chez des patients atteints de mélanomes (456, 457)(voir revues (458-460)). Toutefois, pour l'ensemble de ces thérapies ciblant B-Raf, il existe un phénomène de résistance (461, 462) (voir revue (463)). Parallèlement à ces efforts de recherche ayant trait aux isoformes de RAF, on a aussi pu observer l'émergence d'un domaine d'étude s'intéressant à l'inhibition de l'activité de Hsp90 à des fins thérapeutiques (voir revue (464)). De nouvelles stratégies thérapeutiques, ciblant à la fois B-Raf V600E directement et le contrôle de l'abondance de B-Raf V600E par Hsp90, ont donc fait l'objet d'études cliniques (465, 466).

La MAP3K Tpl-2 peut aussi activer la voie de signalisation MEK/ERK, notamment dans le cas de la réponse immunitaire innée (467, 468). D'une façon comparable à celle des isoformes de RAF, la stabilité de Tpl-2 est elle aussi régulée par son interaction avec des protéines chaperonnes. D'une part, Tpl-2 interagit avec la sous-unité p105 de NFκB (469). Cette interaction induit la stabilisation des deux protéines (470). D'autre part, le complexe Tpl-2/p105 interagit avec la protéine ABIN-2, qui est elle aussi nécessaire à la stabilité de la protéine Tpl-2 (471). De manière surprenante, alors que l'abondance protéique de Tpl-2 est

réduite en l'absence d'expression de ABIN-2, p105 semble quant à elle indépendante de cette dernière. En revanche, dans des cellules n'exprimant pas p105, la protéine ABIN-2 n'est plus détectable (471). D'après la littérature existante, il n'est pas donc possible de déterminer si l'effet stabilisateur de la sous-unité p105 de NFκB sur Tpl-2 est dû à leur interaction directe ou au recrutement de la protéine ABIN-2. En revanche les deux protéines régulent positivement la fonction de Tpl-2 dans l'activation de la voie MEK/ERK dans un contexte d'immunité innée en maintenant une fraction cellulaire suffisante de la protéine (472, 473). L'activation des récepteurs TLR4 par le LPS induit la phosphorylation de la sérine 400 de Tpl-2 par la kinase IKK-β (474). En réponse à cette phosphorylation, Tpl-2 n'interagit plus avec p105 et ABIN-2 et devient disponible pour phosphoryler MEK (469, 471, 474). Toutefois, cette levée d'inhibition induit une déstabilisation de la protéine. Ce mécanisme semble introduire un contrôle temporel de l'activation de la voie MEK/ERK en réponse à l'activation des récepteurs de l'immunité innée, toutefois aucune étude publiée n'a abordé la régulation de Tpl-2 sous cet aspect.

La MAP3K c-Mos, impliquée dans la signalisation ERK1/2 lors de la progression méiotique semble, elle aussi, être dégradée par le système ubiquitine-protéasome. Des travaux menés au début des années 1990 dans les gamètes et œufs de xénope commun (*Xenopus laevis*) ont montré une régulation dynamique de la stabilité de la protéine. En effet, la protéine semble être particulièrement instable au cours de phase précoce de la méiose, en contraste avec les phases tardives de ce processus (475). De la même façon, après la fertilisation et l'activation des œufs de *X. laevis*, la protéine c-Mos est dégradée par le système ubiquitine-protéasome (476, 477). Le maintien de haut niveaux protéiques de c-Mos, et donc d'une forte activité MEK/ERK, est donc nécessaire pour le maintien d'un arrêt cellulaire, nécessaire à la fertilisation (478, 479). Les déterminants moléculaires qui régulent la stabilité de c-Mos ont fait l'objet de plusieurs études qui pour certaines d'entre elles entrent en contradiction. Il a initialement été rapporté que c-Mos est un substrat de la machinerie de la règle du N-terminal (N-end rule), dont le signal de dégradation est la proline 2 (475, 476). De plus, ces mêmes études rapportent que la phosphorylation de la sérine 3 est essentielle pour le maintien de la stabilité de la protéine. Il a ensuite été montré que ce résidu est phosphorylé par le complexe cycline B/Cdc2 (480). Lors de la fertilisation et l'activation des œufs de xénope, la cycline B est dégradée, la sérine 3 de c-Mos est déphosphorylée (480). En conséquence sa lysine 34 est

ubiquitinée et la protéine dégradée par le protéasome (475). Ces travaux laissent donc sous-entendre que le signal de dégradation N-terminal de c-Mos serait constitué de deux composantes : la proline N-terminale et la phosphorylation de la sérine 3. Toutefois, les études antérieures menées sur le fonctionnement du N-end rule suggèrent que la présence d'un résidu proline aurait un effet stabilisateur sur la plupart des protéines (481, 482). Une étude approfondie du signal de dégradation de c-Mos, menée par le groupe de Alexander Varshavsky, pionnier de l'étude de la règle du N-terminal, a montré que la proline, au lieu d'être un signal direct de dégradation, jouait un rôle indirect dans la stabilité de c-Mos en étant un régulateur négatif de la phosphorylation de la sérine 3 (483). Ces caractéristiques font de c-Mos la première protéine dont la dégradation par la machinerie du « N-end rule » dépend de la phosphorylation d'un résidu de son N-degron.

Chez la levure *S. cerevisiae*, la protéine kinase Ste11 est une MAP3K impliquée dans la signalisation Fus3, qui s'apparente à la signalisation ERK1/2. Cette voie de signalisation contrôle notamment l'arrêt du cycle cellulaire et la conjugaison cellulaire en réponse aux phéromones ainsi que la réponse à l'hyperosmolarité de glycérol. En réponse à une stimulation phéromonique, la protéine Ste11 est dégradée par un mécanisme dépendant de l'ubiquitine activé par une boucle de rétrocontrôle impliquant la signalisation MAPK (484). Cette régulation semble être en partie responsable du caractère transitoire de la réponse aux phéromones chez *S. cerevisiae*.

Les MAP2K de ERK1/2 sont les protéines MEK1/2. Il n'existe pas de données dans la littérature qui décrivent une régulation de la stabilité de MEK1/2. Toutefois, dans les études mesurant la stabilité des protéines à l'échelle du génome, la protéine MEK2 est décrite comme une protéine avec une demi-vie courte (278). De plus, une étude d'identification de substrats des complexes CRL menée par le groupe de Stephen J. Elledge suggère que l'inhibition chimique des complexes CRL et l'expression d'un dominant négatif des complexes CRL1 induit une stabilisation de MEK2 (281). Toutefois, aucune confirmation obtenue avec des techniques plus spécifiques n'a à ce jour été publiée.

La protéine Ste7, MAP2K de la signalisation Ste11/Ste7/Fus3-Kss1 précédemment évoquée, est ubiquitinée par le complexe SCF<sup>cdc4</sup> et la E2 conjuguase cdc34 en réponse à une phosphorylation par Ste11 induite par une stimulation phéromonique (485-487). Cette

ubiquitination mène à la dégradation de Ste7, induisant la reprise du cycle cellulaire après un arrêt induit par les phéromones (485, 486). Il s'agirait donc, de la même façon que pour Ste11, d'un système de contrôle temporel de la signalisation en réponse aux phéromones.

Les MAP Kinases ERK1 et ERK2 sont des protéines stables qui ne sont pas habituellement considérées comme régulées par leur dégradation protéique. A titre d'illustration, dans des cellules HEK293, les niveaux d'expression protéiques de ERK1 ne montrent aucun signe de diminution après 8 heures de traitement avec un inhibiteur de la synthèse protéique et ne sont pas augmentés en réponse à une inhibition du protéasome (134). Il existe toutefois des études indiquant que ERK1/2 peuvent être régulées au niveau de leur abondance protéique dans des conditions particulières. Lors d'un stress hyperosmotique induit par du sorbitol, les protéines ERK1/2 semblent être ubiquitinées par MEKK1 (qui possède un domaine PHD à activité E3 ubiquitine ligase) et dégradées par le protéasome (488). Toutefois plusieurs études publiées postérieurement ne rapportent pas d'effets de traitements au sorbitol sur les quantités protéiques de ERK1/2 (489). De plus, la stabilité de ERK1/2 n'est pas modulée différenciellement dans des souris mutantes exprimant la forme sauvage de MEKK1 ou une forme mutante dépourvue de son activité ubiquitine ligase (490). En revanche, des études réalisées chez la Drosophile par le groupe de Marc Therrien montrent que la protéine MAPK, homologue de ERK1/2, est régulée par sa dégradation. Dans un crible génomique réalisé dans des cellules S2 de *D. melanogaster*, les auteurs ont identifié le gène *Usp47* comme un régulateur de l'activité MAPK (491). Cette observation a mené à la caractérisation de USP47 comme un régulateur post-traductionnel de MAPK, qui stabilise la protéine (492). Un crible génomique réalisé dans un contexte où l'expression de USP47 est inhibée par ARN interférant a ensuite permis d'identifier les composantes de la machinerie de la règle du N-terminal, UBC6, UFD4 et POE, ainsi que la E3 ligase associée KCMF1, comme des régulateurs de la stabilité de MAPK (492). Il n'est toutefois pas établi si MAPK est régulée directement par la règle du N-terminal, ou si un facteur stabilisateur de la protéine, comme une protéine chaperonne par exemple, pourrait être impliqué. Ainsi, même si l'inhibition du protéasome ou de l'enzyme E1 induit une accumulation de la protéine dans un contexte où USP47 est inhibée, il n'a pas été démontré jusqu'à présent que la protéine MAPK de *D. melanogaster* peut-être directement ubiquitiné (492). De plus, la pertinence de ces



observations dans des cellules de mammifères n'a pas encore fait l'objet d'études publiées dans la littérature. Finalement, la demi-vie de la protéine semble d'approximativement 13 heures (492). Contrairement aux protéines à la demi-vie courte, où la stabilité joue un rôle primordial dans le contrôle de l'activité totale, l'importance relative de cette régulation pour la fonction MAPK globale reste donc encore à évaluer.

### **1.2.5.2 Signalisation p38**

Il existe de nombreuses MAP3K qui peuvent, dépendamment des contextes cellulaires, activer les différentes signalisation p38. Certaines de ces protéines sont impliquées à la fois dans la signalisation p38 et JNK, elles seront toutefois traitées uniquement dans ce chapitre. Parmi ces MAPKKK, certaines ont été décrites comme régulée par la système ubiquitine-protéasome.

Les MAP3K MEKK1-4 sont des activateurs des voies p38 et JNK. MEKK1 est un substrat de l'ubiquitine ligase Deltex dans des lymphocytes T (493). En réponse à la signalisation du récepteur aux cellules T (TCR), MEKK1 est activé ce qui induit son ubiquitination par Deltex et sa dégradation par le protéasome (493). En conséquence la protéine Deltex régule négativement l'activation des voies p38 et JNK dans les lymphocytes T en réponse à une stimulation du TCR. La protéine MEKK2 est elle aussi régulée par le système ubiquitine-protéasome, mais cette régulation ayant été décrite dans le contexte de la signalisation JNK, elle est abordée au chapitre suivant. Finalement, il n'existe pas de données suggérant que MEKK3 et MEKK4 soient régulée par leur dégradation protéique. Les données de stabilité protéique à grande échelle indiquent que MEKK3 semble être une protéine parmi les plus stables (278).

La protéine ASK1 est activée en réponse aux stress et à l'inflammation. Plusieurs régulations, dépendantes du contexte cellulaire ont été décrites dans la littérature. Dans le cas

d'un stress oxydatif, il a été montré que ASK1 peut être ubiquitinée par la E3 ubiquitine ligase Roquin-2 menant à sa dégradation par le protéasome dans des lignées HeLa et 293T (494). De manière intéressante, les auteurs de cette étude ont démontré que cette régulation est conservée entre les homologues de ces gènes chez le nématode *C. elegans* (494). De la même façon, la ligase CHIP semble ubiquitiner ASK1, et promouvoir sa dégradation, dans des fibroblastes COS-7 en réponse à un stress oxydatif (495). De plus, la protéine Thioredoxine, partenaire d'interaction de ASK1, semble aussi jouer un rôle dans le contrôle de l'ubiquitination et la dégradation de cette dernière dans la réponse des cellules endothéliales à ce stress, mais les mécanismes moléculaires de cette régulation ne sont pas déterminés (496). Ces mécanismes semblent entrer en compétition avec l'activité de la déubiquitinase USP9X, qui stabilise la forme activée de ASK1, dans un contexte de stress cellulaire induit par les ROS (497). L'ensemble de ces régulations permettrait un contrôle de la signalisation pro-apoptotique *via* p38 et JNK dans ces différents types cellulaires (494, 495, 497). Toutefois, la compétition entre ces différentes signalisations, et leur restriction ou non à un type cellulaire n'a pas fait l'objet d'études approfondies, ce qui permettrait de mieux comprendre la dynamique des régulations de la stabilité de ASK1 dans un contexte de stress oxydatif. Les signalisations médiées par ASK1 peuvent aussi être activées en réponse au facteur de nécrose tumorale TNF $\alpha$ . Dans ce contexte, l'activation de ASK1 induit son ubiquitination et sa dégradation (498, 499). Deux ubiquitine ligases, SOCS1 et c-IAP1, ont été décrites pour contrôler cette régulation, l'une dans les cellules endothéliales, l'autre dans les lignées T et B ((498) et (499) respectivement). Ces études ont montré que dans ces contextes cellulaires, de la même façon que ce qui est observé pour la réponse au stress oxydatif, la conséquence de ces régulations est un contrôle temporel des signalisation JNK et p38.

La protéine Mixed-lineage kinase 3 (MLK3) est une MAP3K activant principalement les signalisation p38 et JNK, dont les niveaux protéiques sont dérégulés dans certains cancers mammaires et ovariens (500, 501). MLK3 est une protéine cliente du système chaperon HSP90/CDC37 (502, 503). C'est de plus un substrat de l'ubiquitine ligase CHIP (504). La polyubiquitination de MLK3 par CHIP nécessite l'activité conjuguase de la protéine UBCH5a (504). La protéine MLK3 est ainsi ubiquitinée et dégradée en réponse à l'inhibition chimique de HSP90, à un choc thermique, un stress osmotique ou à une stimulation au TNF $\alpha$  (502, 504,

505). Les conséquences fonctionnelles de ces régulations sur les signalisations MAP Kinases dans chacun de ces contextes restent à déterminer, mais il a été montré que la régulation de MLK3 par CHIP est un régulateur négatif de l'invasion dans des modèles cellulaires de cancers ovariens (504).

La MAP3K « delta like non-canonical Notch ligand 1 » (DLK1) contrôle la signalisation PMK-3 (homologue de p38 chez *C. elegans*) dans la morphogenèse des synapses neuronales et des cils cellulaires (506, 507). Dans cet organisme modèle, DLK-1 est un substrat du complexe E3 ligase de type RNF composé des protéines RPM-1 et FSN-1 (506, 508, 509). Ces dernières catalysent la polyubiquitination et la dégradation protéasomique subséquente de DLK1, régulant ainsi la signalisation PMK-3 et la formation de synapses fonctionnelles. Les régulations de DLK1 par le système ubiquitine-protéasome, et d'une manière plus générale le rôle de DLK1 dans le contrôle de la signalisation p38, n'ont pas fait l'objet d'autres études en dehors de ce contexte spécifique.

La MAP3K « Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ -activating kinase 1 » (TAK1), active plusieurs signalisations en réponse à l'inflammation, parmi lesquelles p38 et JNK. Les études de stabilité protéomique indiquent que TAK1 semble avoir une demi-vie relativement courte (510). De plus, TAK1 est détectée comme un substrat potentiel des complexes CRL4, par des approches d'identification à grande échelle réalisées avec l'inhibiteur MLN4924 ou avec un dominant négatif de la Culine 4 (281). De plus, il a été démontré que la stimulation par le TNF $\alpha$  induit l'ablation de chaînes d'ubiquitine poly-K63 et la conjugaison de chaînes poly-K48 sur la protéine TAK1 par le complexe DUB/E3 ligase Cyld/Itch, menant à sa dégradation par le protéasome et à la terminaison de sa signalisation (431). Toutefois, la protéine TAK1 est activatrice de nombreuses signalisations, dont la voie NF- $\kappa$ B, et il n'est pas établi quel est l'impact spécifique de cette régulation sur les voies p38 et JNK.

Finalement, les MAP3K TAO1/2 peuvent activer la signalisation p38 mais sont peu caractérisées. Il n'existe pas d'étude publiée qui caractérise la régulation de la stabilité protéique de ces kinases.

Les MAP2K des isoformes de p38 sont principalement MKK3 et MKK6. Cette dernière est un substrat de la E3 ubiquitine ligase FBXO31. En réponse à un stress génotoxique MKK6 est activée, induisant son interaction, sa polyubiquitination par FBXO31 et sa dégradation par le protéasome (511). Cette régulation semble avoir pour effet de limiter la signalisation p38 dans le temps et FBXO31 serait donc un régulateur négatif de l'apoptose, induite en réponse au stress génotoxique, dépendante de la signalisation p38 (511). Il n'existe à notre connaissance pas de données publiées traitant de la régulation de la stabilité de la protéine MKK3. MKK4 peut activer p38 dans certaines conditions, mais les régulations de sa stabilité ayant été rapportée dans le contexte de l'activation de JNK, elles sont traitées au chapitre suivant.

Il existe 4 isoformes de p38 : p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  et p38 $\delta$ . Il n'existe pas de littérature décrivant une régulation majeure de leur activité par le contrôle de leur stabilité protéique. Cependant, tous les isoformes sont décrits comme des protéines ayant une demi-vie courte à moyenne dans les études à l'échelle du protéome (278, 510). De plus, dans un contexte où p38 $\alpha$  et p38 $\gamma$  sont surexprimées dans des cellules 293T, les deux protéines semblent ubiquitinées et p38 $\gamma$  semble être dégradée par le protéasome par un processus qui semble dépendant de l'activité de p38 (512). Toutefois, aucune étude n'a permis d'établir si les protéines endogènes sont régulées de cette manière et si ce processus est pertinent dans le contrôle de l'activité de p38. En revanche, de manière similaire à ce qui observé pour ERK3 et MK5, la protéine MK2, substrat de p38, participe à la stabilisation de cette dernière. Les deux protéines forment un complexe protéique, indépendant de l'activité catalytique de MK2, qui induit la stabilisation de p38. En conséquence l'abondance protéique de p38 est diminuée dans les cellules et les tissus qui n'expriment pas MK2 (513).

### **1.2.5.3 Signalisation JNK**

La plupart des MAP3K de la signalisation JNK activent aussi la voie p38. En conséquence leurs régulations sont traitées au chapitre précédent.

Dans les ostéoblastes, la protéine MEKK2 est ubiquitinée par la ligase Smurf1, résultant dans sa dégradation par le protéasome (514). L'inhibition de Smurf1 dans ces cellules induit une accumulation de MEKK2 et une augmentation de la signalisation JNK - mais pas de la signalisation p38 – qui se traduit par une augmentation de l'activité des ostéoblastes et un déséquilibre de l'homéostasie osseuse chez la souris (514).

La protéine ASK2 est un homologue de ASK1 qui n'active pas les signalisations ERK1/2 ou p38 mais induit l'activité de la voie JNK (515). Elle forme un hétérodimère avec ASK1, et il a été démontré que cette interaction est nécessaire à la stabilisation de la protéine dans des cellules de mammifères (516). L'absence d'interaction avec ASK1 induit la dégradation de ASK2 par le protéasome.

Les protéines kinases MEK4 et MEK7 sont des MAP2K activant les isoformes de JNK. S'il n'existe aucune étude de la stabilité de MEK7, il a été montré que MEK4 est ubiquitinée par la ligase Itch et dégradée par le protéasome. Cette régulation est une boucle de rétrocontrôle activée en réponse à un choc osmotique qui est dépendante de l'activation de JNK (517). Les conséquences fonctionnelles de cette régulation sur la réponse au stress osmotique n'ont toutefois pas été déterminées.

Il n'existe pas de données qui suggèrent que les trois isoformes de JNK soient régulées par leur dégradation protéique. Toutefois, la protéine Spc1, homologue des JNK chez la levure *S. pombe*, lie la protéine chaperonne cdc37, ce qui induit sa stabilisation (518). En conséquence, des cellules mutantes pour cdc37 ont des niveaux d'expression inférieurs pour les gènes de réponse aux stress cellulaires normalement induits par la voie de signalisation Spc1 (518). Il est intéressant de noter que contrairement à la plupart des protéines clientes de la protéine cdc37, qui le sont aussi pour Hsp90 dans la plupart des cas, l'abondance protéique de Spc1 semble indépendante de cette dernière.

#### **1.2.5.4 Signalisation ERK5**

Les protéines MEKK2, MEKK3 et Tpl-2 ont été décrites comme des MAP3K pouvant activer la signalisation MK5/ERK5. Étant aussi des activateurs des signalisations p38 et JNK, leurs régulations sont traitées aux chapitres précédents.

La protéine MEK5 est décrite comme un substrat présomptif des complexes CRL à Culline 4 (CRL4) dans une étude d'identification à large échelle publiée par la groupe de Stephen J. Elledge. En effet, l'expression d'un mutant négatif de la Culline 4 induit une augmentation de son « indice de stabilité protéique » en réponse à un agent UV-mimétique, ce qui suggère une stabilisation de la protéine (281). Les auteurs de cette étude ont ensuite confirmé par des approches de western blot que la protéine MEK5 est bien stabilisée par l'expression de la Culline 4 non active. Il semblerait donc que dans des cellules où est induit un dommage à l'ADN de type UV, il y ait une dégradation de la protéine MEK5 dépendante de complexes CRL4. Toutefois, en dehors de l'observation du groupe de Stephen J. Elledge, cette régulation potentielle n'a pas fait l'objet d'étude publiée dans la littérature. De plus, il existe peu d'informations sur le rôle et les régulations de MEK5 dans un contexte de dommage de l'ADN de type UV. Seule une étude publiée montre que l'absence de MEK5 dans des fibroblastes embryonnaires murins ne semble pas induire de différence dans l'induction de l'apoptose en réponse à des rayonnements UV (519).

Finalement, la protéine ERK5 humaine est une protéine cliente de Hsp90 et Cdc37. En effet, alors que sa surexpression chez la levure *S. cerevisiae* permet de compenser la perte d'activité de la protéine kinase Slt2p, l'inhibition de Hsp90 annule cette fonction (520). De plus, la perte d'activité de Hsp90 ou de Cdc37 mène à l'ubiquitination et la dégradation de ERK5 (521). Une étude indépendante suggère quant à elle que ERK5 est un substrat d'un complexe ubiquitine ligase comprenant la protéine von Hippel-Lindau (pVHL) dans plusieurs lignées cellulaires humaines (522). L'ubiquitination et la dégradation subséquente de ERK5 seraient dépendantes de l'hydroxylation de prolines par des prolyl-hydroxylases (PHD), de la même façon qu'un autre substrat de pVHL bien caractérisé, le facteur de réponse à l'hypoxie HIF1 $\alpha$  (522). Toutefois, s'il est clair que ERK5 est dégradée par le système ubiquitine-protéasome, les régulations de ce contrôle restent peu claires. En effet, il semblerait que ERK5 soit stabilisée lorsqu'elle est activée, c'est-à-dire lorsqu'elle est phosphorylée sur son motif

TEY par MEK5 (521). Au contraire, d'autres travaux suggèrent que la protéine est sous le contrôle de l'activité de pVHL dans des lignées de cellules issues de carcinomes rénaux à cellules claires, dans un contexte où la protéine semble active (522). Les modalités de la régulation de l'ubiquitination – notamment les interactions fonctionnelles entre les systèmes PHD-pVHL et Hsp90 - et de la dégradation de ERK5 dans différents contextes restent donc à complètement caractériser.

#### **1.2.5.5 Signalisation ERK7 (ERK8)**

La signalisation ERK7 semble majoritairement activée par autophosphorylation, il n'existe donc pas de MAP3K et de MAP2K connues pour la réguler.

La protéine ERK7 est dégradée de manière constitutive par le système ubiquitine-protéasome dans les cellules de mammifères (523). La protéine a une demi-vie courte d'approximativement 2 heures dans des cellules en croissance exponentielle. Les 20 acides aminés N-terminaux de ERK7 forment un domaine qui est particulièrement important pour la dégradation de la protéine, puisque son remplacement par la séquence homologue de ERK2 suffit à stabiliser la protéine (523). Bien que la machinerie d'ubiquitination de ERK7 ne soit pas identifiée, la fonction des complexes SCF semble importante pour sa dégradation puisque l'expression d'un dominant négatif de la Culline 1 induit une stabilisation de la protéine. Finalement, le contrôle de la stabilité de ERK7 est un processus conservé et régulé, puisqu'il a été montré, dans des cellules de *D. melanogaster* S2, que la déplétion du milieu en acides aminés induit une stabilisation de ERK7, causant une accumulation de la protéine et une augmentation de sa signalisation (98). Au contraire, l'induction d'un stress génotoxique par le MMS induit une diminution de l'expression de la protéine ERK7, d'une manière dépendante de l'activité du protéasome (524). La régulation de ERK7 par le UPS est donc un processus dynamique qui module sa fonction.

#### 1.2.5.6 Signalisation ERK3/4

Les protéines PAK de groupe I ont récemment été montrées comme des activatrices de ERK3 et ERK4, à ce titre elles peuvent être considérées comme des MAP2K de la signalisation ERK3/4. Peu d'études se sont intéressées à la régulation de la stabilité des protéines de ce groupe, mais il semblerait que PAK1 et PAK2 soit ubiquitinées et dégradées par le protéasome (525, 526). Cette dégradation semble être, au moins dans le cas de PAK1, dépendante de l'activité kinase de la protéine, il pourrait donc s'agir d'une boucle de rétroaction.

La MAP Kinase atypique ERK3 a une demi-vie d'approximativement 30 minutes (134). Il s'agit donc d'une protéine fortement instable. Il existe une corrélation positive entre la taille des protéines et leur demi-vie (278). La protéine ERK3 humaine est composée de 721 acides aminés, soit approximativement deux fois la taille médiane des protéines humaines (527). Basé sur les différents modèles prédictifs, qui en plus de la taille de la protéine prennent en compte différentes caractéristiques structurales comme sa composition en acides aminés et la composition de son N-terminal, ERK3 devrait être une protéine classée dans le quartile des protéines les plus stables (278, 528). Ces informations indiquent donc que la protéine ERK3 est spécifiquement ciblée pour la dégradation protéique par un système actif. Cette idée est en accord avec le fait que l'accumulation de ERK3 pourrait être délétère. A l'échelle de la cellule, il a été montré que l'expression d'une forme stable de ERK3 dans des fibroblastes induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (134). A l'échelle de l'organisme, il a été montré que la protéine ERK3 est surexprimée dans les carcinomes pulmonaires à cellules squameuses et les données suggèrent que la présence accrue de la protéine promouvrait la progression tumorale (112). Il semble donc que le système de dégradation de ERK3 soit important pour conserver l'homéostasie cellulaire.

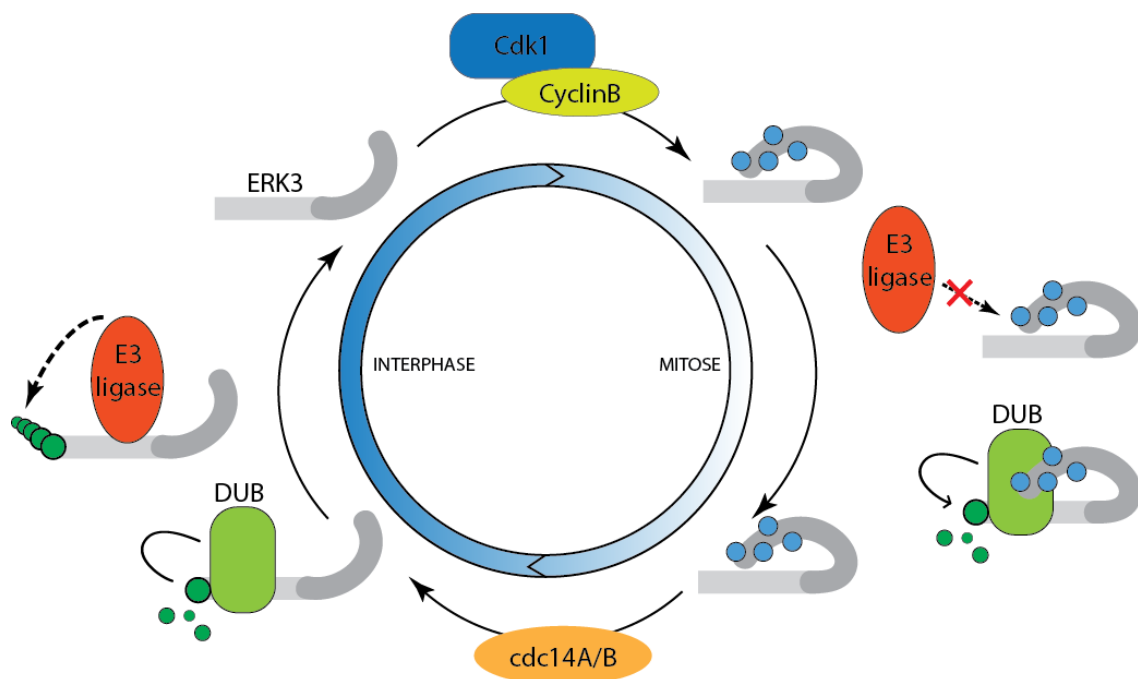
En accord avec ces observations, il a été démontré que la protéine ERK3 est constitutivement ubiquitinée et dégradée par le système ubiquitine-protéasome dans des cellules en prolifération (134). La dégradation de la protéine est contrôlée par la présence de deux petites régions N-terminales de 15 et 20 acides aminés nommées « N-terminal



degradation region 1 and 2 » (NDR1/2). La protéine ERK3 est dégradée par le processus d'ubiquitination N-terminale (353).

Il n'existe que peu d'informations sur les mécanismes moléculaires contrôlant la stabilité de ERK3. Il convient néanmoins de noter que MK5, protéine interagtrice et substrat de ERK3, semble jouer un rôle de protéine chaperonne pour cette dernière. En effet, l'expression de MK5 induit une augmentation de l'expression de la protéine ERK3 (116, 119). De plus, dans la seule étude s'intéressant à la régulation de la stabilité de ERK3 qui n'a pas été réalisée dans le laboratoire du Dr. Meloche, il a été suggéré que ERK3 est hydroxylée sur sa proline 25 par la prolyl hydroxylase PHD3, ce qui induirait sa stabilisation (529).

Il existe des contextes physiologiques où la régulation de la stabilité de ERK3 est modulée. Ainsi, il a été montré que la différenciation de précurseurs neurogéniques et myoblastiques *in vitro* induit une accumulation de la protéine causée par sa stabilisation (134). De plus, la phosphorylation de quatre résidus sérine de l'extension C-terminale de la protéine par le complexe cycline B/CDK1 lors de la mitose de cellules HeLa en mitose stabilise la protéine (138). À l'inverse, lors de la sortie de mitose, ces résidus sont déphosphorylés par les phosphatases Cdc14A/B, suggérant ainsi un mécanisme de retour de la kinase à son état instable (voir figure 13).



**Figure 14.      Modèle de la régulation de ERK3 dans les différentes phases du cycle cellulaire.**

Au contraire son homologue, la protéine ERK4 se présente sous la forme d'une protéine stable qui ne semble pas être un substrat du protéasome (106, 117). Il ne semble pas que sa stabilité soit régulée de manière spécifique, ni que son activité dépende de sa dégradation.

#### **1.2.5.7 Autres signalisations MAPK : le cas des plantes**

Il existe plusieurs voies de signalisation MAP Kinases chez les plantes (voir revue (530)). Même s'il a été établi que certaines de ces signalisations sont « de type ERK », il n'existe pas d'homologue évident des signalisations p38 ou JNK. Le cas des signalisation MAPK de plantes est donc à analyser à part de celles du règne animal.

Les connaissances en biologie cellulaire chez la plante sont moins avancées, il n'est donc pas surprenant qu'il n'existe que peu d'informations sur le contrôle des signalisations MAPK par la régulation de la stabilité des effecteurs protéiques. Chez *Arabidopsis thaliana*, la protéine MAP3K18, impliquée dans la réponse à l'acide abscissique (une phytohormone impliquée dans la croissance et la réponse au stress), est dégradée par le système ubiquitine-protéasome (531). Ce processus est inhibé par la protéine phosphatase ABI1, il semble donc que cette dégradation est phospho-dépendante. Il semblerait donc intéressant de déterminer, si comme pour de nombreuses MAP3K du règne animal, la dégradation de MAP3K18 est un processus déclenché en réponse à son activation.

#### **1.2.5.8 Régulations des MAP Kinases par leur stabilité : conclusions**

Il semble exister deux principaux mécanismes de régulations de la stabilité des composantes des voies MAP Kinases qui dépendent de l'interaction avec le système de

protéines chaperonnes HSP90/cdc37 pour l'un et du système ubiquitine-protéasome uniquement pour l'autre. Ces systèmes ne sont pas auto-exclusifs mais fonctionnent en coopération, puisque les protéines clientes de HSP90 semblent pour la plupart être dégradées par le UPS lorsqu'elles ne sont plus stabilisées.

Une des principales limites qui se pose dans l'exercice de dresser le portrait global de la régulation des MAPK par leur stabilité est le peu de littérature disponible sur le sujet. Il n'existe pas d'analyse méthodique et systématique de la régulation des membres d'une voie de signalisation. Les études à grande échelle de l'ubiquitination ou de la dégradation des protéines peuvent donner des informations qui suggèrent ces régulations, mais les limites technologiques font qu'elles ne couvrent pas l'ensemble du protéome, et les systèmes rapporteurs utilisés peuvent induire des biais expérimentaux (voir revue (532)). De plus, à l'exception de quelques protéines pour lesquelles le phénomène est bien étudié, les mécanismes moléculaires de la stabilité des MAPK sont en général peu caractérisés. En conséquence, si on connaît plus ou moins bien certains mécanismes de régulation indépendamment les uns des autres, on ne sait pas de quelle manière ils s'intègrent et interagissent entre eux pour coordonner le fonctionnement d'une voie MAPK.

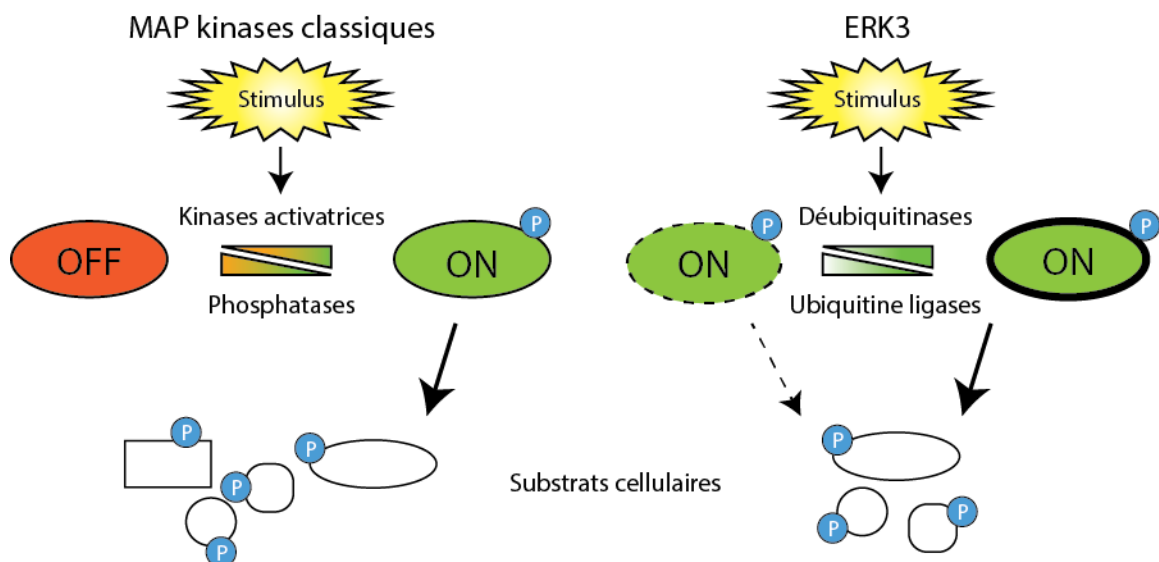
Les signalisations p38 et JNK partagent de nombreuses MAP3K et peuvent donc être activées par les mêmes stimuli. Il est intéressant de noter que s'il n'existe que peu de régulations par le système ubiquitine-protéasome des modules MAP2K et MAPK pour ces signalisations, la majorité des MAP3K de p38 et JNK sont contrôlées par leur stabilité. De plus, la dégradation de certaines de ces enzymes est activée dans les mêmes contextes cellulaires. C'est le cas notamment de l'inflammation ou du stress oxydatif qui activent les signalisations p38 et JNK et parallèlement induisent l'ubiquitination et la dégradation de plusieurs MAP3K. S'il apparaît que certains de ces mécanismes sont restreint à des types cellulaires spécifiques, comme les cellules endothéliales ou les cellules du système immunitaire, il semble néanmoins qu'il puisse y avoir une certaine redondance entre les régulations des MAP3K par le système ubiquitine-protéasome, notamment lors de l'inflammation. Il serait donc intéressant de déterminer la part relative de chacune de ces régulations dans la réponse cellulaire globale à ces stimuli. L'étude de la combinaison de ces mécanismes n'a jusqu'à ce jour pas fait l'objet d'article publié.

Le groupe des MAP Kinases atypiques est composé de ERK3/4, ERK7/8 et NLK. Parmi ces protéines, ERK3 et ERK7 sont dégradées de manière constitutive par le système ubiquitine-protéasome. De manière intéressante, les modalités de contrôle de la dégradation de ERK3 et ERK7 sont remarquablement similaires. La dégradation des deux protéines est dépendante de domaines spécifiques dans leur partie N-terminale, appelé « N-dégrons » (134). Le remplacement de ces domaines par la partie N-terminale de ERK2 suffit à stabiliser ces deux protéines. D'autre part, le signal de dégradation induit par les N-dégrons de ERK3 et de ERK7 est un signal fort, puisque son addition à l'extrémité N-terminale de la GFP suffit à induire la dégradation de cette dernière.

La régulation de ERK3 et ERK7 est une forme non conventionnelle de régulation pour des MAP Kinases. En effet, les signalisations MAPK classiques sont contrôlées par le système UPS en réponse à leur activation. Il s'agit dans la plupart des cas d'un contrôle temporel de la signalisation, qui permet de moduler le caractère transitoire du signal. Dans le cas de ERK3 et ERK7 le système semble fonctionner de manière inverse. Dans des cellules au repos, les signalisations sont constitutivement inhibées par la dégradation des MAPK. En réponse à des stimuli spécifiques, qu'il s'agisse par exemple de la mitose pour ERK3 ou d'une carence métabolique pour ERK7, les protéines sont stabilisées, levant l'inhibition sur leur signalisation. De manière intéressante, et encore une fois à l'inverse des MAPK conventionnelles, ERK3 et ERK7 sont toutes les deux des protéines qui sont constitutivement phosphorylées sur leur boucle d'activation (75, 218). Leur stabilisation suffit donc à promouvoir les fonctions cellulaires qu'elles contrôlent. De plus, comme la pression de dégradation sur ces enzymes est forte en conditions normales, quand le stimulus de dégradation s'atténue, les signalisations ERK3 et ERK7 retournent à des niveaux basaux. Les modalités de régulation de ERK3 et ERK7 sont donc différentes de celles des MAP Kinases conventionnelles mais le résultat sur la dynamique de leur signalisation est donc comparable.

## Hypothèses et objectifs

La MAP Kinase atypique ERK3 présente un mode de régulation unique au sein de la famille des MAP Kinases. Contrairement aux autres membres de ce groupe, la protéine semble constitutivement phosphorylée sur sa boucle d'activation. La kinase ERK3 serait donc toujours dans un état actif. De plus, la protéine ERK3 est une protéine instable, constitutivement dégradée par le système ubiquitine-protéasome dans des cellules en prolifération. Cette régulation de la stabilité de ERK3 est un processus dynamique, car il peut être modulé par certains stimuli. Au vu de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que la stabilité de la protéine ERK3 est un des régulateurs majeurs de son activité biologique. Ainsi, contrairement aux MAP Kinases classiques qui oscillent entre un état inactif (OFF) et un état actif (ON), et dont l'activité est régulée par les actions contradictoires de kinases activatrices et phosphatases inhibitrices, la MAP Kinase atypique ERK3 serait toujours dans un état actif (ON) et son activité biologique serait régulée par un réseau de déubiquitinases et d'ubiquitine ligases (figure 14).



**Figure 15. Hypothèse de la régulation de l'activité biologique de ERK3.**

Afin de pouvoir étudier cette hypothèse, il convient d'identifier les régulateurs de ERK3 pour pouvoir moduler leur activité. Ainsi, l'objectif principal de ce travail de doctorat est d'identifier les composantes du système ubiquitine-protéasome qui régulent la stabilité de la MAP Kinase atypique ERK3. Nos travaux visent aussi à déterminer si ces régulateurs sont capables de moduler les fonctions cellulaires de la protéine. Finalement, étant donné que lesdites fonctions sont encore peu comprises, nous avons comme objectif secondaire d'utiliser l'identification des régulateurs de ERK3 pour mettre en lumière des hypothèses de nouvelles fonctions pour la protéine.

## **CHAPITRE II – Article 1 : The Deubiquitinating Enzyme USP20 Regulates ERK3 Stability and Biological Activity**

### **2.1 Mise en situation**

L'objectif de cette étude était d'identifier les déubiquitinases qui régulent positivement la stabilité de ERK3 à l'aide d'un crible fonctionnel. Les résultats que nous avons obtenus ont corroborés certains résultats préliminaires obtenus par Paul Délérís, un ancien chercheur postdoctoral du laboratoire, ciblant USP20 comme régulateur potentiel de ERK3. J'ai ensuite poursuivi la caractérisation des relations moléculaires entre ERK3 et USP20 et montré une nouvelle fonction pour la signalisation ERK3-USP20 dans la régulation du cytosquelette d'actine et de la migration cellulaire. Pendant le temps que j'ai passé à préparer cet article, plusieurs études ont été publiées confirmant le rôle de ERK3 dans la migration cellulaire.

J'ai conçu et réalisée la majorité des figures de l'article, à l'exception de la figure 2A qui a été réalisée par Paul Délérís. Les figures 1A et 5 ont chacune été réalisées en collaboration, avec Laure Voisin et Mathilde Soulez respectivement. J'ai écrit le manuscrit qui a été corrigé par Sylvain Meloche.

Cet article a été publié dans le journal *Molecular and Cellular Biology* en Mai 2017 (accepté et prépublié en ligne en Février 2017).

## **The Deubiquitinating Enzyme USP20 Regulates ERK3 Stability and Biological Activity**

**Simon Mathien<sup>ab</sup>, Paul Délérès<sup>a\*</sup>, Mathilde Soulez<sup>a</sup>, Laure Voisin<sup>a</sup> and Sylvain**

**Meloche<sup>abc#</sup>**

Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie<sup>a</sup>; Departments of Molecular Biology<sup>b</sup>  
and Pharmacology<sup>c</sup>, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Running title: Usp20 is an Erk3 deubiquitinase

# Corresponding author: Dr Sylvain Meloche, [sylvain.meloche@umontreal.ca](mailto:sylvain.meloche@umontreal.ca)

\* present address:

Mer, Molécules, Santé EA 2160

FR Université de Nantes - CNRS - Ifremer 3473

UFR Sciences et Techniques 2 Rue de la Houssinière, BP 92208

44322 Nantes Cedex 3



## 2.2 Abstract

Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) is an atypical mitogen-activated protein (MAP) kinase whose regulatory mechanisms and biological functions remain superficially understood. Contrary to most protein kinases, ERK3 is a highly unstable protein that is subject to dynamic regulation by the ubiquitin-proteasome system. However, the effectors that control ERK3 ubiquitination and degradation are unknown. In this study, we carried out an unbiased functional loss-of-function screen of the human deubiquitinating enzyme (DUB) family and identified ubiquitin-specific protease 20 (USP20) as a novel ERK3 regulator. USP20 interacts with and deubiquitinates ERK3 both *in vitro* and in intact cells. Overexpression of USP20 results in the stabilization and accumulation of ERK3 protein, whereas USP20 depletion reduces the levels of ERK3. We found that the expression levels of ERK3 correlate with that of USP20 in various cellular contexts. Importantly, we show that USP20 regulates actin cytoskeleton organization and cell migration in a manner dependent on ERK3 expression. Our results identify USP20 as a *bona fide* regulator of ERK3 stability and physiological functions.

## 2.3 Introduction

Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3) along with its paralogous kinase ERK4 define a distinct subfamily of atypical mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (1). ERK3 is expressed ubiquitously in adult mammalian tissues, with the highest levels found in the central nervous system, skeletal muscle, lung, thymus and testis (2-4). ERK4 shows a more restricted expression profile, and is predominantly detected in brain tissue (4). Much remains to be learned about the substrates and physiological functions of these signaling enzymes. Contrary to classical MAPKs like ERK1/ERK2, cJun NH<sub>2</sub>-terminal kinases and p38s that phosphorylate a large spectrum of substrates, ERK3 and ERK4 appear to have restricted substrate specificity. Their best-characterized and validated substrate is the protein kinase

MK5 (5-8). Genetic invalidation studies in the mouse have revealed important functions of ERK3 in foetal growth, pulmonary maturation, thymocyte development and neuromuscular control (9-12). Biochemical and cellular studies also suggest that ERK3 plays key roles in transcriptional control, cell adhesion, cell migration and DNA damage response (13-16). The physiological functions of ERK4 are unknown.

The activity of ERK3 and ERK4 is regulated in part by phosphorylation of the Ser-Glu-Gly motif in the activation loop, which stimulates their intrinsic kinase activity and affinity for the substrate MK5 (17, 18). We and others have identified group I p21-activated kinases as ERK3/ERK4 activation loop kinases (19, 20). Of note, the activating phosphorylation of ERK3/ERK4 is not modulated by classical MAPK stimuli or by any other extracellular stimuli tested, suggesting that other regulatory mechanisms control their biological activity (17).

ERK3 is a short-lived protein with a half-life of 30–60 min that is constitutively degraded by the ubiquitin-proteasome system in proliferating cells (21). The turnover of ERK3 involves two degrons found in the N-terminal lobe of the kinase domain that are both necessary and sufficient to target ERK3 for proteasomal degradation. Phosphorylation of ERK3 in the C-terminal extension by CDK1 leads to its transient accumulation in mitosis as a result of protein stabilization (22). ERK3 is also stabilized and accumulates with time during myogenic differentiation of C2C12 myoblasts (21). These observations lend strong support to the importance of protein turnover in regulating the signaling functions of ERK3.

The effectors of the ubiquitin-proteasome system that control ERK3 protein degradation remain to be identified. In this study, we performed a comprehensive loss-of-function RNAi screen of the human deubiquitinating enzymes (DUBs) that regulate ERK3 protein levels and identified ubiquitin-specific protease 20 (USP20) as the first ERK3 DUB. USP20 (also known as von Hippel-Lindau protein interacting deubiquitinating enzyme 2) was first identified as a substrate of the cullin-RING ligase (CRL) family member CRL2<sup>VHL</sup> (23,

24). Subsequent work reported that it deubiquitinates hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , inducing its stabilization and therefore antagonizing CRL2<sup>VHL</sup> action (25). In addition to its role in hypoxia, USP20 has been implicated in the DNA damage response by promoting the deubiquitination and stabilization of Rad17 and Claspin (26-28). Recent findings also uncovered a novel function of USP20 in the morphogenesis of granule neuron dendrites and axons (29). Here we report that USP20 binds to and directly deubiquitinates ERK3, resulting in the stabilization of the kinase. Importantly, USP20 was found to regulate ERK3-dependent control of actin cytoskeleton dynamics and cell migration. Our results identify USP20 as a regulator of ERK3 biological functions.

## 2.4 Material and methods

### Reagents and antibodies

Rhodamine-phalloidin was purchased from Molecular Probes. Cycloheximide and N-ethylmaleimide (NEM) were from Sigma. SMARTpool siRNAs targeted to USP20 and ERK3 were obtained from Dharmacon. Recombinant USP20 protein was from Abnova. The Human ON-TARGETplus DUBs siRNA library was purchased from Dharmacon. The following TRC lentiviral shRNA constructs for human *USP20* were purchased from Sigma: TRCN0000007609 (shUSP20-A) and TRCN0000007611 (shUSP20-B).

Commercial antibodies were from the following sources: anti-USP20 (A301-189A) from Bethyl Laboratories; anti-ERK3 (EP1720Y) from Abcam; anti-MK5 (M32220-050) from BD Biosciences; anti-phospho-MK5(T182) (36-007) from Upstate Biotechnology; anti-HSP27 (2402) and anti-phospho-HSP27(S82) (2406) from Cell Signaling Technologies; anti-HSC70 (sc-7298), anti-HA (sc-805) and anti-GAPDH (sc-25778) from Santa Cruz Biotechnology.

### Plasmid constructs

pCMV6-XL4-USP20 was from Origene. The plasmids pcDNA3-Myc<sub>6</sub>-ERK3 wild type (WT) and truncated mutant 1-365 $\Delta$  (WT and 0K mutant), pMT123-HA-Ubiquitin, pcDNA3-HA-ERK3-GST have been previously described (17, 30). pLenti6-USP20 and pLenti6-GFP-ERK3

were generated by subcloning the inserts from pCMV6-XL4-USP20 and pcDNA3-Myc-ERK3 respectively into pLenti6 and pLenti6-GFP vectors. All mutations and PCR products were verified by DNA sequencing. Details about cloning strategies are available upon request.

### **Cell culture, transfections and lentiviral infections**

293T, HeLa, MCF-7, hMEC 184A1, ZR-75-B, SKBR3, T47D, MDA-MB-231, Hs578T, MCF10A and HT-29 cells were obtained from American Tissue Culture Collection. HCC1937 cell line was kindly provided by S. Mader (Université de Montréal). C2C12 myoblasts were obtained from J.F. Côté (Université de Montréal). The cells were cultured in DMEM or RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. Muscle differentiation of C2C12 myoblasts was induced by replacing growth medium (GM) (DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum) with differentiation medium (DM) (DMEM supplemented with 2% horse serum) when cells reached 90% confluence. Cell lines were routinely tested for mycoplasma contamination.

293T cells were transiently transfected using polyethylenimine. Other cell lines were transfected using Lipofectamine 3000 (Invitrogen) following manufacturer's protocol. For siRNA transfections, the cells were transfected with RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For lentiviral infections, 293T cells were transfected with pMD2/VSVG, pMDLg/pRRE, pRSV/Rev and indicated pLenti6 construct. After 48 h, virus-containing culture media were filtered and used to infect HeLa cells. Polyclonal populations of infected cells were obtained by selection with blasticidin. shRNA lentiviral infections of MCF10A cells were performed as above and populations of infected cells were selected with puromycin.

### **Immunoblotting and immunoprecipitation**

Cell lysis, immunoprecipitation and immunoblot analysis were performed as described (21, 31, 32). For immunoprecipitation experiments, 750 µg of lysate proteins were incubated with the indicated antibodies for 2-4 h at 4°C. Cycloheximide-chase experiments were carried out as described (21). Protein levels were quantified by densitometry analysis of immunoblotting data. ERK3 half-life was estimated by either one-phase decay or linear curve fitting. The

choice between the two models was determined by the quality of the fit based on R-squared value.

### **Deubiquitination assays**

For *in vivo* deubiquitination assays, 293T cells were transfected with expression vectors for HA-ERK3-GST or HA-ERK3(1-365)-His<sub>6</sub> together with HA-ubiquitin. After 48 h, the cells were treated with 20  $\mu$ M of the proteasome inhibitor MG132 for 16 h. The cells were lysed in lysis buffer supplemented with 10 mM NEM. Cell lysates (750  $\mu$ g of protein) were then incubated for 2 h at 4°C with 20  $\mu$ l of glutathione-agarose beads (GE Healthcare) for HA-ERK3-GST or Ni-NTA-agarose beads (Qiagen) for HA-ERK3(1-365)-His<sub>6</sub>. Bound proteins were washed four times in lysis buffer and resolved by SDS-PAGE. Ubiquitin-containing conjugates were detected by immunoblotting with anti-HA antibody. For *in vitro* deubiquitination assays, HA-ERK3-GST was affinity-purified from cell lysate and then incubated with recombinant USP20 in deubiquitination buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 5% glycerol) for 2 h at 37°C. Ubiquitination of ERK3 was analyzed by anti-HA immunoblotting.

### **Wound healing assays**

Cell migration was assessed using a wound-healing assay. The cells were grown as a single monolayer in 12-well plates and then wounded using a 200- $\mu$ L pipet tip. Phase-contrast microscopy images of the wound area were taken at time 0, 24 and 48 h and wound healing was estimated by measuring the areas of the wound using ImageJ software.

### **Quantitative PCR Analysis**

Real-time quantitative PCR was performed as previously described (33), with following primers:

MAPK6 (AGGTGACTTTGGTCTTGCA CGGA/GCAGCCCACATGTCAATGGCTTTA)

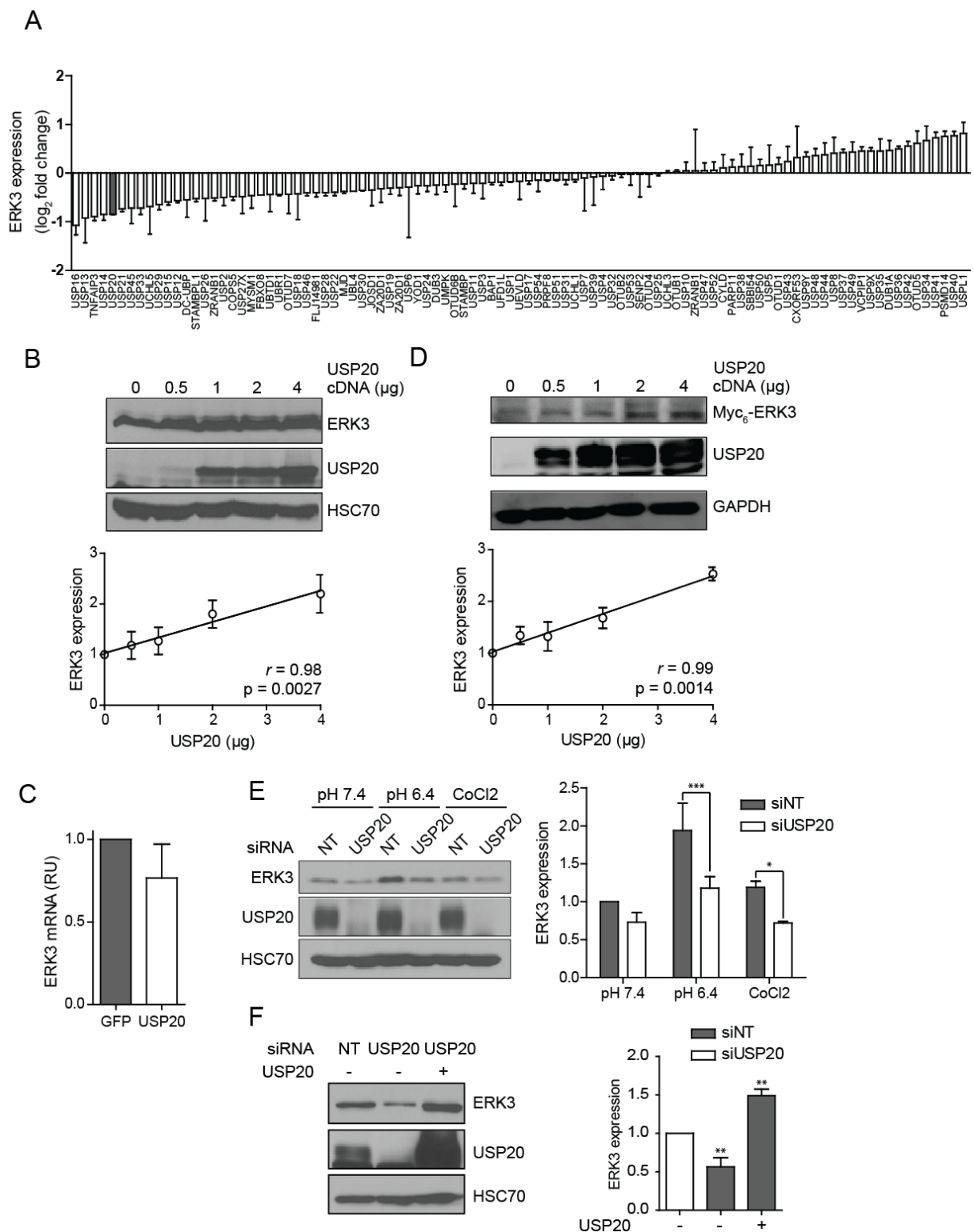
GAPDH (AGCCACATCGCTCAGACAC/GCCCAATACGACCAAAT CC)

ACTB (ATTGGCAATGAGCGGTTC/TGAAGGTA GTTTCGTGGATGC)

## 2.5 Results

### 2.5.1 The DUB USP20 regulates ERK3 protein levels by increasing its stability

We used a systematic and unbiased approach to identify DUBs that regulate ERK3 protein levels. A genome-scale RNAi screen of the human DUB family was performed using a library of SMARTpool siRNAs to individually deplete the 99 annotated DUBs in the human colon adenocarcinoma cell line HT-29. The expression of endogenous ERK3 protein was monitored by immunoblot analysis. From this screen, silencing of 5 DUBs induced a decrease in ERK3 protein levels by at least 40% (Fig. 1A). One of these enzymes, USP20, has been previously identified by global proteomic analysis as a candidate ERK3 interacting protein (34). We therefore sought to determine whether USP20 regulates ERK3 expression and biological activity. We first examined the effect of ectopically overexpressing USP20 on ERK3 protein levels in 293T cells. Expression of increasing amounts of USP20 resulted in a dose-dependent increase in the levels of ERK3 protein with a strong linear correlation (Pearson's  $r = 0.98$ ) (Fig. 1B). To rule out any transcriptional effect of USP20 on ERK3 expression, we measured ERK3 mRNA expression by RT-qPCR. Overexpression of USP20 had no significant effect on ERK3 mRNA levels in these cells (Fig. 1C). We also tested the ability of USP20 to regulate the levels of ERK3 transcribed from an exogenous promoter. For these experiments, 293T cells were co-transfected with Myc<sub>6</sub>-tagged ERK3 and increasing amounts of USP20. As for endogenous ERK3, increasing the levels of USP20 led to a dose-dependent and linear increase of ERK3 protein abundance ( $r = 0.99$ ) (Fig. 1D). We also examined the contribution of the related DUB USP33, which share 59% amino acid identity with USP20. However, overexpression of USP33 did not result in the accumulation of ERK3, suggesting that USP20 has a more prominent role in the regulation of ERK3 expression.



**Figure 1. The DUB USP20 regulates ERK3 protein levels.**

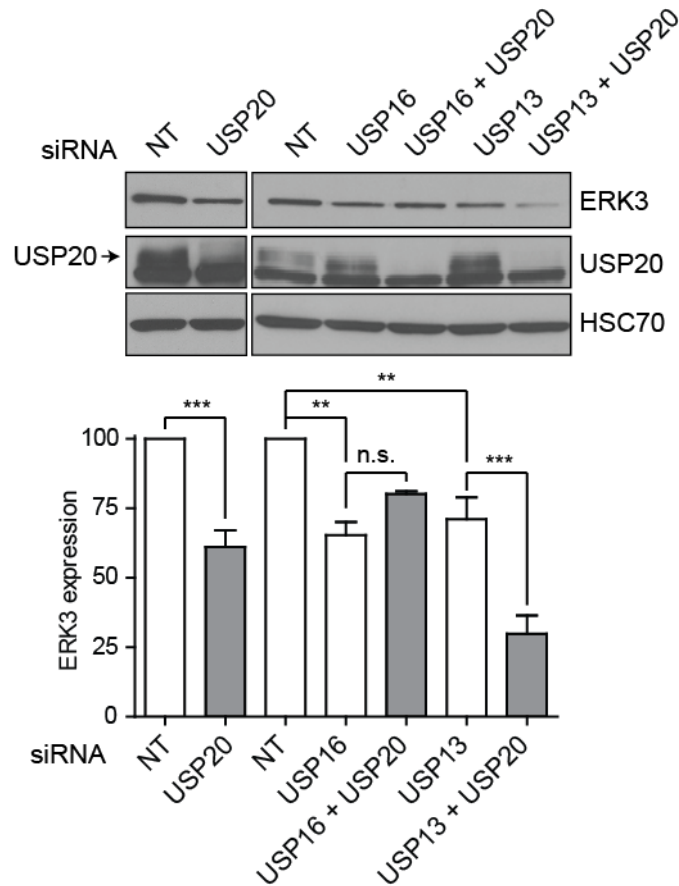
(A) HT-29 cells were transfected in duplicates with individual SMARTpool siRNAs targeting 99 human DUBs. After 72 h, cell extracts were analyzed by immunoblotting with anti-ERK3 antibody and anti-tubulin used as loading control. The blots were quantified by densitometry and the mean expression value of two independent

experiments was calculated. Results are expressed as the mean log<sub>2</sub> fold change relative to control siRNAs. Error bars indicate standard deviation. (B) 293T cells were transfected with increasing amounts of pCMV6-XL4-USP20 as indicated. After 48 h, cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-ERK3 antibody and anti-HSC70 as loading control. Upper panel, representative blot. Lower panel, quantification of ERK3 expression was performed on three independent experiments. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. (C) 293T cells were transfected with 2  $\mu$ g of pCMV6-XL4-USP20. RNA was extracted 48 h after transfection and ERK3 mRNA was quantified by RT-qPCR. (D) 293T cells were co-transfected with pcDNA3-Myc<sub>6</sub>-ERK3 and increasing amount of pCMV6-XL4-USP20 as indicated. Expression of ERK3 was analyzed by immunoblotting as described in B. (E) HeLa cells were transfected with SMARTpool USP20 siRNAs. After 48 h, the cells were exposed to pH 6.4 acidic medium or treated with 0.5 mM CoCl<sub>2</sub> for 3 h. Expression of ERK3 was analyzed by immunoblotting as in B. Statistical significance was determined by two-way ANOVA with Bonferroni post-test using Graph Pad Prism Software version 5. (F) HeLa cells were transfected with SMARTpool USP20 siRNAs in absence or presence of pCMV6-XL4-USP20 plasmid. After 48 h, the cells were exposed to pH 6.4 acidic medium for 3 h and ERK3 expression was analyzed by immunoblotting. Statistical significance was determined by one-way ANOVA with Bonferroni post-test. \*\*\*P < 0.001; \*\* P < 0.01; \*P < 0.05.

We further evaluated the effect of USP20 depletion on ERK3 protein levels in HeLa cells. For these experiments, we examined the impact of USP20 silencing in a cellular context associated with the accumulation of ERK3. Unpublished observations from our lab and others (35) have revealed that ERK3 expression is up-regulated upon acidification of the medium or hypoxic conditions. HeLa cells were transfected with USP20 siRNAs and, after 48 h, the cells were either treated with the hypoxia-mimetic agent CoCl<sub>2</sub> or the culture medium was replaced with a medium adjusted to pH 6.4. Depletion of USP20 significantly lowered ERK3 protein levels in cells exposed to CoCl<sub>2</sub> or acidic medium (Fig. 1E). Finally, to rigorously validate that the inhibition of ERK3 expression was the result of USP20 depletion, we performed rescue experiments. Overexpression of USP20 completely rescued the decrease in ERK3 expression observed in HeLa cells transfected with USP20 siRNAs and exposed to acidic conditions (Fig. 1F).

USP20 silencing only modestly reduces ERK3 protein expression, which may reflect the involvement of multiple redundant ERK3 DUBs. To test this hypothesis, we examined the impact of simultaneously depleting USP20 with either USP13 or USP16, the two best hits in our DUB RNAi screen (Fig. 1A). In agreement with the results of the screen, depletion of USP13 or USP16 alone modestly but significantly reduced the levels of ERK3 in HeLa cells cultured in acidic medium (Fig. 2). Importantly, silencing of both USP13 and USP20 together resulted in a larger decrease in ERK3 expression, suggesting that the two DUBs cooperatively regulate ERK3 protein levels. No such additive effect was observed with USP16 siRNAs.

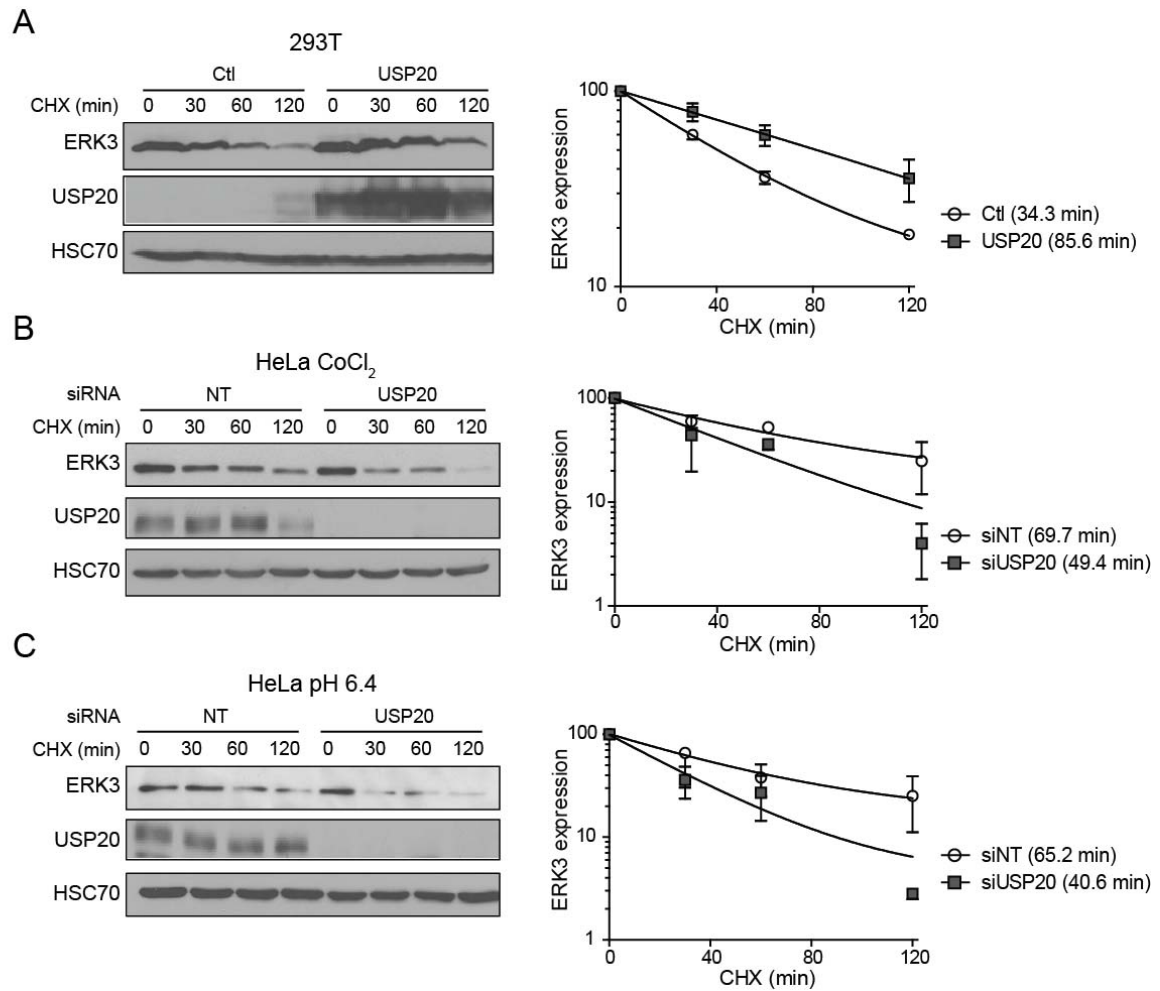




**Figure 2. USP13 cooperates with USP20 to regulate ERK3 protein expression.**

HeLa cells were transfected with the indicated SMARTpool siRNAs. After 48 h, cells were exposed to pH 6.4 acidic medium for 3 h and lysates were analyzed by immunoblotting with anti-ERK3 antibody. Upper panel, representative immunoblot. Lower panel, quantification of ERK3 levels was performed on three independent experiments. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical significance was determined by one-way ANOVA with Bonferroni post-test. \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ .

ERK3 expression level is controlled by protein turnover (21). To determine if USP20 affects the stability of ERK3, we measured the half-life of ERK3 by cycloheximide-chase experiments. Overexpression of USP20 prolonged the half-life of endogenous ERK3 by 2.5-fold, consistent with its accumulation (Fig. 3A). Reciprocally, depletion of USP20 by siRNAs significantly shortened the half-life of ERK3 in cells treated with  $\text{CoCl}_2$  or cultured in acidic medium (Fig. 3B and 3C). Together, these results demonstrate that USP20 regulates ERK3 expression by increasing its stability.



**Figure 3. USP20 stabilizes ERK3.**

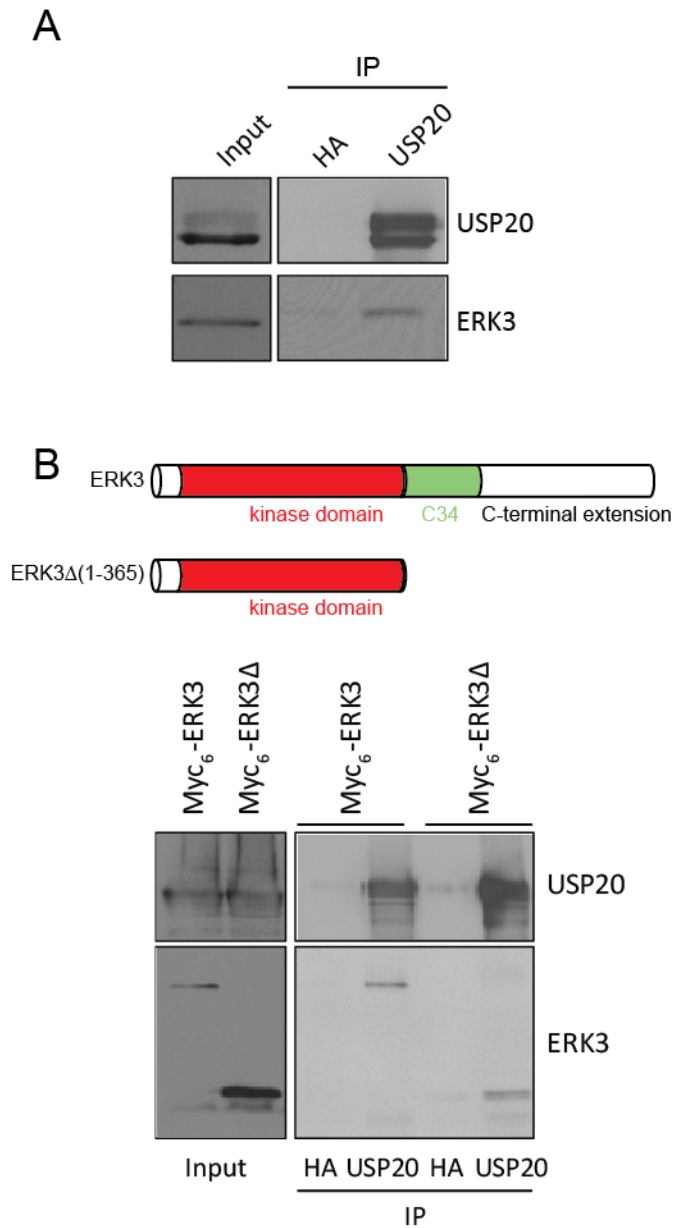
(A) 293T cells were transiently transfected with empty vector (Ctl) or pCMV6-XL4-USP20. After 48 h, the cells were treated with 100  $\mu$ g/ml cycloheximide (CHX) for the indicated times. Endogenous ERK3 levels were analyzed by immunoblotting. (B, C) HeLa cells were transfected with SMARTpool USP20 siRNAs. After 48 h, the cells were treated with 0.5 mM CoCl<sub>2</sub> (B) or switched to pH 6.4 culture medium (C) for 3 h. The half-life of endogenous ERK3 was measured by cycloheximide-chase. Left panels, a representative blot is shown. Right panels, quantification of immunoblotting data performed on three independent experiments. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of relative ERK3 expression normalized to 0 min time point. Degradation curves were fitted to a one-phase decay model.

### 2.5.2 USP20 interacts with and deubiquitinates ERK3

Interestingly, ERK3 has been identified as a candidate USP20 interacting protein ( $D^N$ -score of 0.83, just below the threshold of high-confidence interacting protein score) in a global proteomic analysis of the DUB interactome (34). To confirm the physical interaction of the

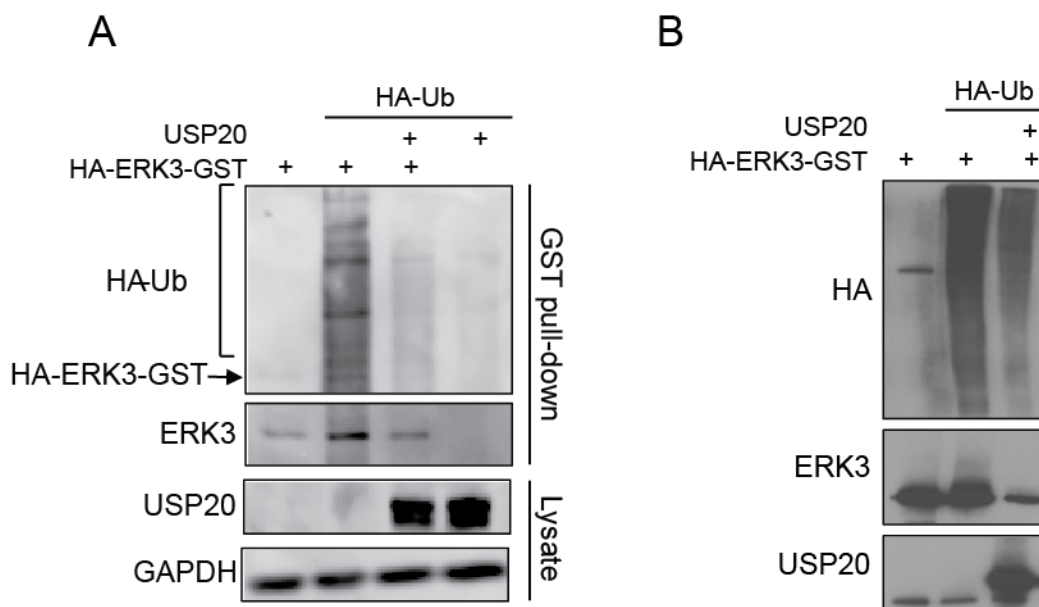
two proteins, we performed co-immunoprecipitation experiments. Endogenous ERK3 was found to co-immunoprecipitate with endogenous USP20 in cells (Fig. 4A). The ERK3 protein is composed of an N-terminal kinase domain and a unique C-terminal extension. Previous studies have shown that ERK3 binds to the cell cycle regulators cyclin D3 (36) and Cdc14A (37) and to the cytoskeletal protein septin 7 (38) through its C-terminal extension. Therefore, we asked if the C-terminal region of ERK3 was necessary for its interaction with USP20. As shown in Fig. 4B, both the full-length ERK3 or a deletion mutant comprising the first 365 amino acids of the protein (ERK3 1-365Δ) formed a complex with endogenous USP20 in 293T cells. This suggests that the kinase domain of ERK3 is sufficient for its interaction with USP20.

USP20 is a DUB and so we investigated whether it regulates ERK3 stability and accumulation through deubiquitination. 293T cells were co-transfected with GST-tagged ERK3 and HA-ubiquitin, in the absence or presence of USP20, and the *in vivo* ubiquitination of ERK3 was analyzed by anti-HA immunoblotting after GST pull-down. We found that expression of USP20 markedly reduces the ubiquitination of ERK3 in cells (Fig. 5A). To determine if ERK3 is a direct substrate of USP20, ubiquitinated ERK3 was isolated from 293T cells by GST pull-down and incubated with purified recombinant active USP20 for *in vitro* deubiquitination. Incubation with USP20 significantly decreased the ubiquitination species of ERK3 (Fig. 5B). We conclude from these results that USP20 is a *bona fide* ERK3 DUB.



**Figure 4. USP20 physically interacts with ERK3.**

(A) Lysates of exponentially proliferating 293T cells were subjected to immunoprecipitation with anti-USP20 or anti-HA antibody used as control (Ctl). Immunoprecipitated proteins were analyzed by immunoblotting with indicated antibodies. (B) 293T cells were transfected with full-length ERK3 or truncated mutant ERK3 1-365 comprising only the kinase domain. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-USP20 and analyzed by immunoblotting.



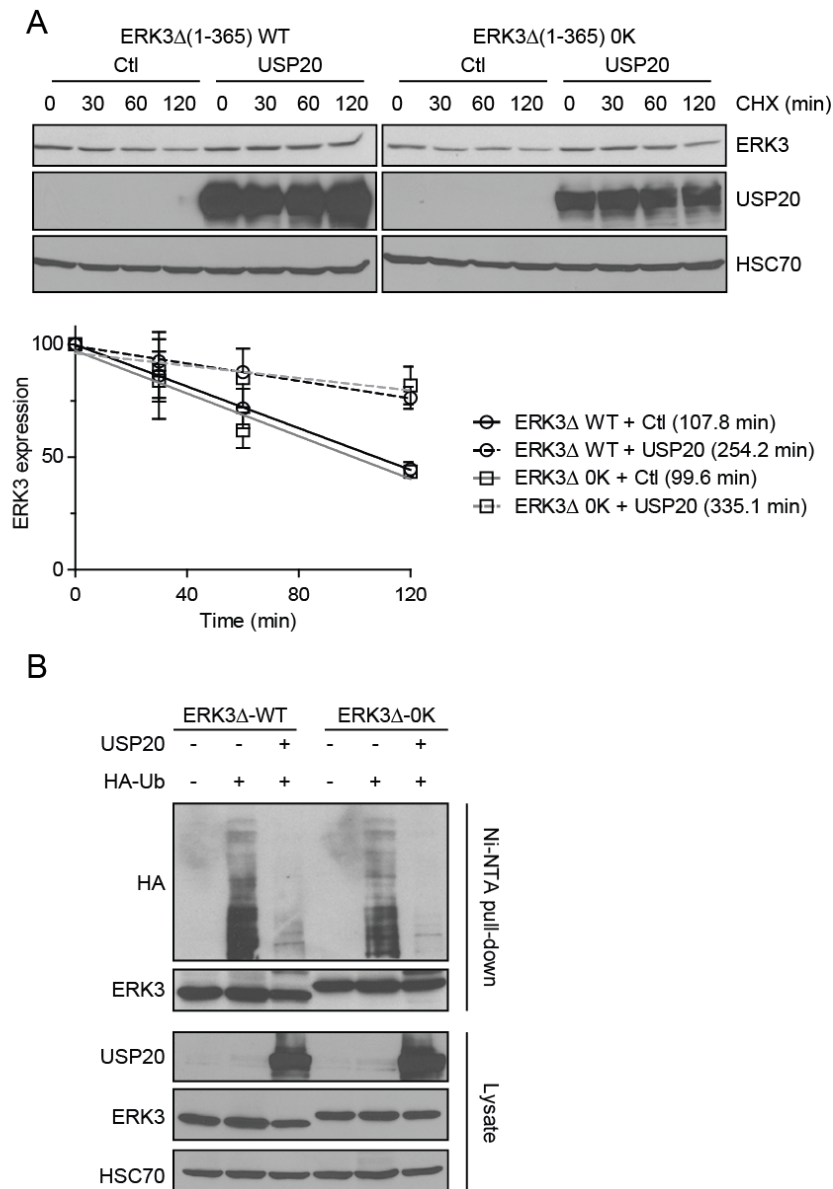
**Figure 5. USP20 deubiquitinates ERK3 *in vivo* and *in vitro*.**

(A) 293T cells were transfected with pcDNA3-HA-ERK3-GST, pMT123-HA-Ubiquitin and pCMV6-XL4-USP20 as indicated. After 48 h, the cells were lysed and ERK3 was pulled-down using glutathione-agarose beads. Ubiquitination was analyzed by immunoblotting with anti-HA antibody. (B) Cells were processed as in A and purified HA-ERK3-GST was incubated with purified recombinant USP20 in deubiquitination buffer for 2 h. Ubiquitination of ERK3 was assessed by immunoblotting with anti-HA antibody.

### 2.5.3 USP20 deubiquitinates and stabilizes a lysine-less ERK3 mutant

We have previously reported that ectopically expressed ERK3 can be conjugated to ubiquitin via its free NH<sub>2</sub> terminus and that a lysine-less mutant of ERK3 is degraded by the proteasome in a ubiquitin-dependent manner in cells (30). We therefore sought to determine if USP20 can regulate the ubiquitination and stability of a lysine-less ERK3 mutant. We first measured the half-life of WT or lysine-less (0K) ERK3Δ(1-365) co-expressed with USP20 in 293T cells. Overexpression of USP20 induced a similar increase of ERK3 protein stability for the WT and lysine-less mutant (Fig. 6A). We next examined the effect of USP20 on the N-terminal ubiquitination of ERK3. HA-ERK3Δ(1-365) WT or lysine-less was co-transfected with HA-ubiquitin in the absence or presence of USP20 and the extent of ERK3 ubiquitination was analyzed by anti-HA immunoblotting. Overexpression of USP20 induced a marked decrease

of the polyubiquitination of both WT and lysine-less ERK3 protein (Fig. 6B). These results indicate that USP20 is active on substrate proteins ubiquitinated at the free amino-terminus.

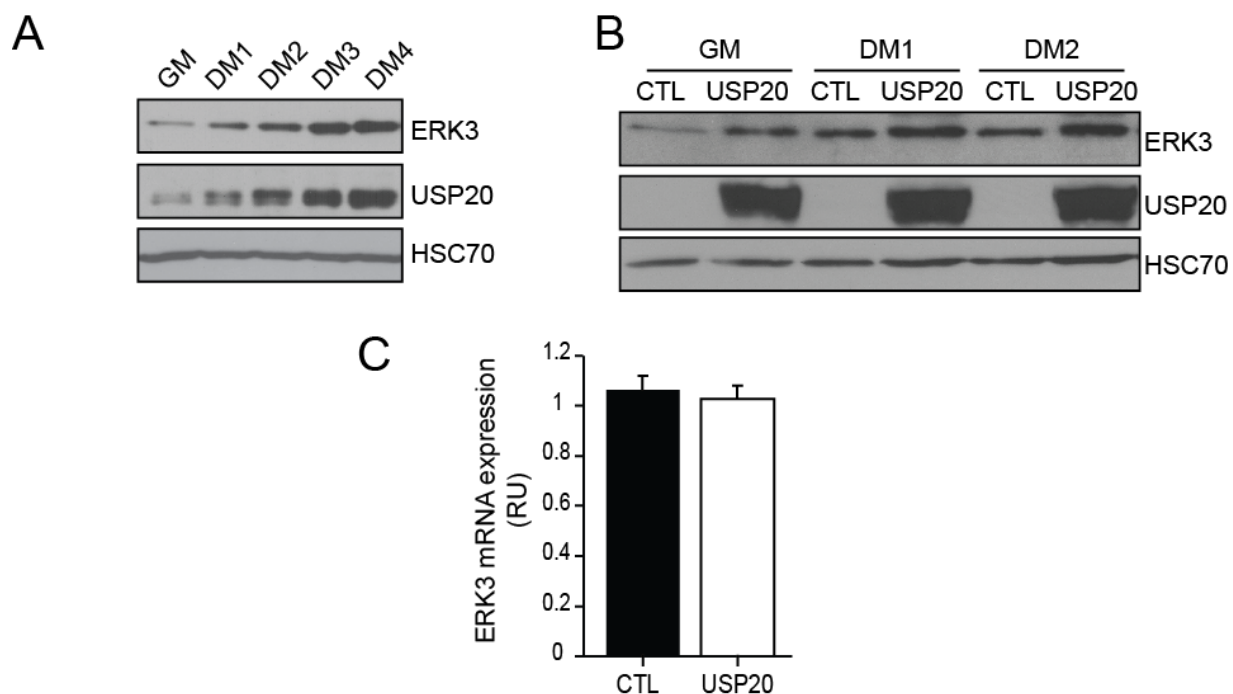


**Figure 6. USP20 regulates the ubiquitination and stability of a lysine-less ERK3 mutant.**

(A) 293T cells were transfected with WT or lysine-less (OK) ERK3 $\Delta$ (1-365) construct. After 48 h, the cells were treated with 100  $\mu$ g/ml CHX for the indicated times. Endogenous ERK3 levels were analyzed by immunoblotting. Upper panels, representative immunoblots. Lower panel, quantification of immunoblotting data was performed on three independent experiments. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of relative ERK3 expression normalized to 0 min time point. Degradation curves were fitted to a linear curve model. (B) 293T cells were transfected with pcDNA3-HA-ERK3 $\Delta$ -His<sub>6</sub> (WT or OK), pMT123-HA-Ubiquitin and pCMV6-XL4-USP20 as indicated. After 48 h, the cells were lysed and ERK3 was pulled-down with Ni-NTA agarose beads. Ubiquitination was analyzed by immunoblotting with anti-HA antibody.

### 2.5.3 USP20 regulates ERK3 protein levels in a myogenic differentiation model

We next studied the physiological importance of the USP20-dependent stabilization of ERK3. We previously reported that ERK3 accumulates as a result of protein stabilization during myogenic differentiation of C2C12 myoblasts (21). Interestingly, we observed that USP20 is co-expressed with ERK3 in C2C12 cells and that its expression is markedly up-regulated during myogenic differentiation with kinetics that parallels the accumulation of ERK3 (Fig. 7A). Overexpression of USP20 in C2C12 cells increased the levels of ERK3 protein both in proliferating cells and in cells undergoing myogenic differentiation (Fig. 7B). No change in ERK3 mRNA expression was observed under these experimental conditions (Fig. 7C). These results identify USP20 as a physiological regulator of ERK3 expression in skeletal muscle cells.



**Figure 7. USP20 controls ERK3 protein levels during myogenic differentiation.**

(A) C2C12 myoblasts were cultured in growth medium (GM) or switched to differentiation medium (DM) for 4 days. Expression of ERK3 and USP20 was analyzed by immunoblotting. (B) C2C12 cells were transfected with empty vector (Ctl) or pCMV6-XL4-USP20 and cultured as above. Expression of ERK3 and USP20 was analyzed by immunoblotting. (C) C2C12 cells were transfected with empty vector (Ctl) or pCMV6-XL4-USP20. After 48 h, the levels of ERK3 mRNA were quantified by RT-qPCR. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

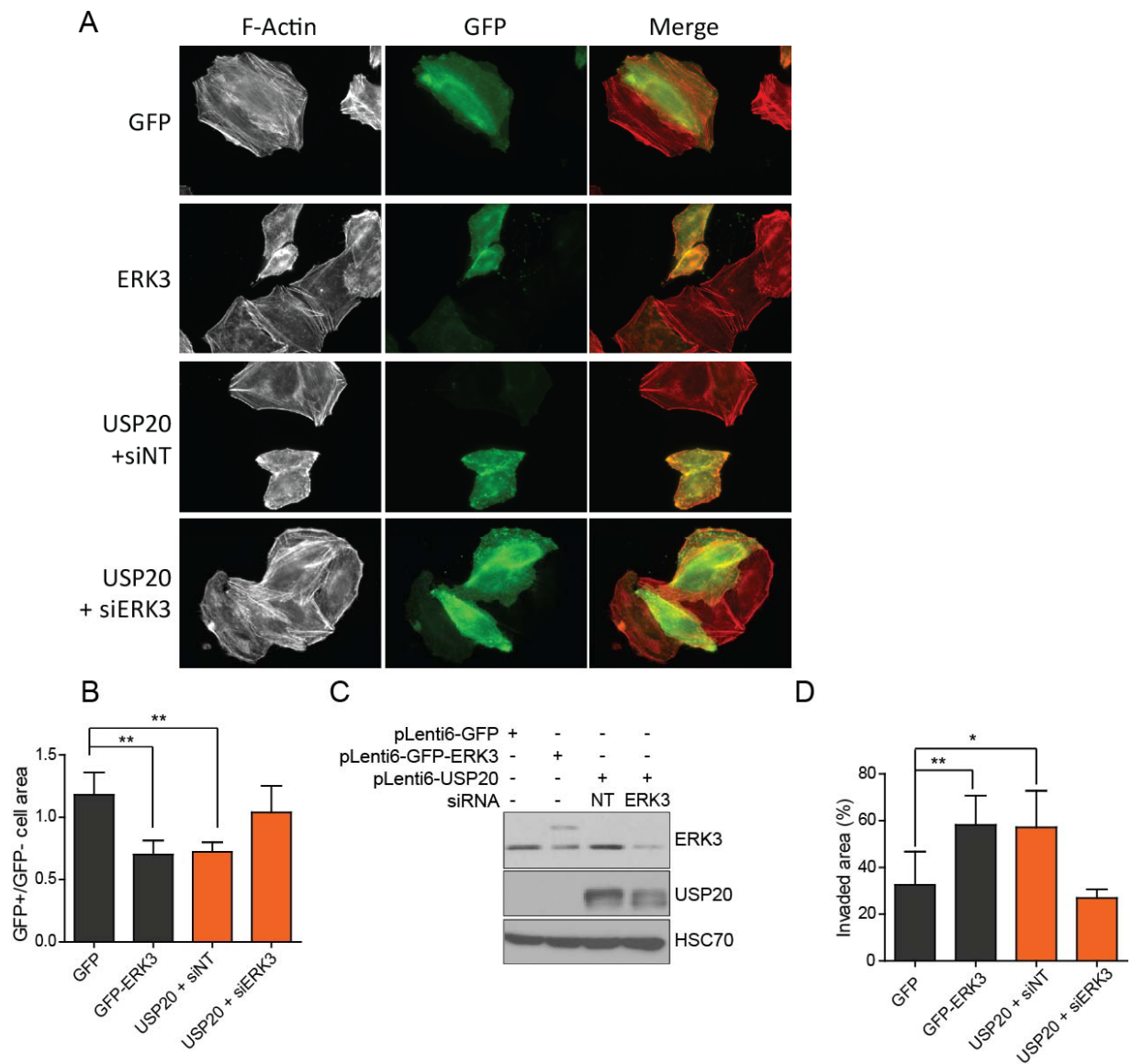
#### **2.5.4 USP20 regulates cell adhesion and migration through ERK3**

ERK3 has been proposed to regulate actin cytoskeleton dynamics and to promote cellular migration in various cell types (13-15). We therefore investigated the possible effect of USP20 on these cellular responses and the contribution of ERK3. In agreement with previous observations (15), ectopic expression of ERK3 in HeLa cells caused a disorganization of the filamentous actin cytoskeleton with a decrease in the number of stress fibers (Fig. 8A). Overexpression of USP20 similarly affected actin cytoskeleton organization and this effect was reversed by depletion of ERK3 (Fig. 8A). Alteration of actin cytoskeleton dynamics translated into a significantly reduced adhesive area in cells transfected with either ERK3 or USP20 (Fig. 8B). Again, the phenotype induced by USP20 was completely rescued by ERK3 silencing. Immunoblot analysis confirmed that ectopic USP20 expression up-regulates ERK3 protein levels in HeLa cells (Fig. 8C). We next examined the impact of USP20 on cell migration. Overexpression of both ERK3 and USP20 enhanced the migration ability of HeLa cells in a wound-healing assay (Fig. 8D). Importantly, the effect of USP20 was abolished by RNAi depletion of ERK3 expression.

We further explored the potential role of the USP20-ERK3 axis in regulating the migration of breast cancer epithelial cells. To determine if USP20 controls ERK3 levels in breast epithelial cells, we first measured the expression of ERK3 and USP20 in a panel of 9 immortalized and transformed breast epithelial cell lines. We observed a strong and statistically significant correlation between the expression of ERK3 and USP20 in these breast epithelial cell lines, suggesting an epistatic relationship (Fig. 9A). To test this hypothesis, we performed loss-of-function experiments in MCF7, T47D and MCF10A cell lines, which all express high levels of USP20 and ERK3. Depletion of USP20 with siRNAs led to a decrease of ERK3 protein levels in all tested cell lines, although the difference did not reach statistical significance for MCF7 cells (Fig. 9B). We next analyzed the impact of USP20 and ERK3 on cell migration. Silencing of USP20 significantly impaired the migration of MCF7 and MCF10A cells in a wound-healing assay (Fig. 9C and 9D). This inhibitory effect was completely rescued by co-



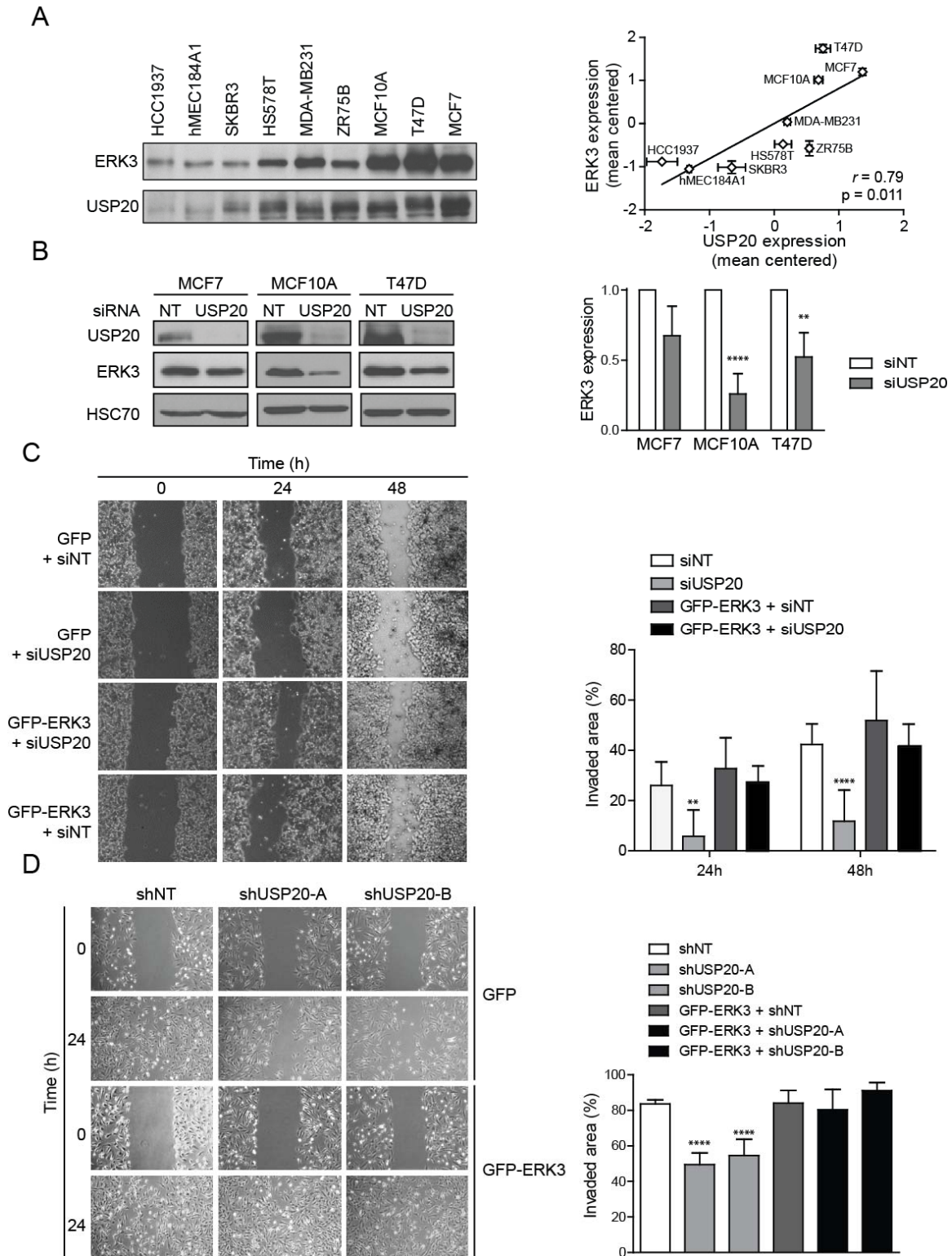
expression of ERK3. These results indicate that USP20-mediated stabilization of ERK3 promotes actin remodeling and cellular migration.



**Figure 8. USP20 regulates actin cytoskeleton dynamics and migration *via* ERK3.**

(A) HeLa cells were transfected with the indicated constructs in the absence or presence of SMARTpool ERK3 siRNAs. After 48 h, the cells were fixed and actin filaments were stained with rhodamine-conjugated phalloidin. Actin cytoskeleton organization was visualized by epifluorescence microscopy. (B) The cellular adhesive area was quantified and is presented as a ratio of transfected (GFP+)/untransfected (GFP-) cells. A minimum of 50 cells was counted and the bar graph represents the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. (C) HeLa cells were infected with lentiviral vectors encoding GFP-ERK3 or USP20 and population of transduced cells were selected with blasticidin. USP20-overexpressing cells were transfected with non-target or SMARTpool ERK3 siRNAs. After 24 h cell were plated at 90% confluence. Twenty-four hours after seeding, confluent monolayer of cells was scraped with a sterile P200 tip. Cell migration was assessed by measuring the surface of the wound area 24 h later by phase-contrast microscopy. The bar graph represents the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Statistical significance was determined by unpaired t-test. \*\*  $p < 0.01$  \*  $p < 0.05$ .





**Figure 9. The USP20-ERK3 axis regulates the migration of breast cancer cells**

(A) Expression of ERK3 and USP20 was analyzed by immunoblotting in a panel of immortalized and transformed breast epithelial cell lines. Protein expression was quantified by densitometry, normalized by

Ponceau S staining and expressed as mean centered expression. (B) MCF7, MCF10A and T47D cells were transfected with SMARTpool USP20 siRNAs. After 48 h, the cells were lysed and ERK3 expression was analyzed by immunoblotting. Left panel, representative immunoblot. Right panel, densitometric quantification of immunoblotting data from three independent experiments. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (C) MCF7 cells were infected with pLenti6-GFP or pLenti6-GFP-ERK3 in the absence or presence of SMARTpool USP20 siRNAs as indicated. After 24 h, the cells were plated at 90% confluence. Twenty-four h after seeding, the cell monolayer was scratched and cellular migration was analyzed by measuring the surface of the wound area after 24 and 48 h of recovery. Statistical significance was determined by two-way ANOVA with Bonferroni post-test. (D) MCF10A cells stably infected with pLenti6-GFP or pLenti6-GFP-ERK3 were infected with two distinct shRNAs targeting USP20. After selection, wound-healing assays were performed as in C. Statistical significance was determined by one-way ANOVA with Bonferroni post-test. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 2.6 Discussion

Unlike classical MAP kinases and most protein kinases, which are stable proteins mainly regulated by phosphorylation and protein-protein interactions, ERK3 is a highly unstable protein kinase that is constitutively degraded by the ubiquitin-proteasome system (21, 30, 39). We have proposed that the biological activity of ERK3 is regulated, at least in part, by its cellular abundance through the control of ubiquitination and protein turnover (21). However, the regulatory pathways and enzymes that control ERK3 ubiquitination and degradation remain to be identified. Using an unbiased functional screening approach, we have identified the DUB USP20 as the first regulator of ERK3 stability. We show that USP20 physically interacts with and directly deubiquitinates ERK3 *in vitro*. Overexpression and loss-of-function experiments revealed that USP20 promotes the deubiquitination of ERK3 *in vivo*, resulting in the stabilization and accumulation of the protein. Importantly, we demonstrate that USP20-dependent stabilization of ERK3 has physiological relevance.

Little is known about the regulation of ERK3 ubiquitination and degradation. The turnover rate of ERK3 is independent of activation loop phosphorylation and kinase activity, indicating that the two processes are uncoupled at least in certain cellular contexts (21). Detailed biochemical analyses have revealed that the N-terminal kinase domain of ERK3 plays a key role in mediating its ubiquitination and degradation by the proteasome (21, 30). Interestingly, we showed that ERK3 can be targeted for degradation via an alternative mode of ubiquitination, involving the conjugation of a polyubiquitin chain to the NH<sub>2</sub> terminus of the

protein (30). In this study, we show that USP20 binds to the N-terminal kinase domain of ERK3 and is able to deubiquitinate both WT and lysine-less ERK3 protein in cells. We also reported that addition of bulky tags (such as Myc<sub>6</sub>) to the N-terminus of ERK3 inhibits its polyubiquitination and stabilizes the protein (30). Overexpression of USP20 leads to further accumulation of ectopic Myc<sub>6</sub>-ERK3 (Fig. 1D), suggesting that multiple ubiquitination pathways control ERK3 turnover. This may prevent the accumulation of ERK3 to high levels that may be deleterious to the cell.

We observed that overexpression of USP20 has a quantitatively greater impact on ERK3 stability than USP20 depletion. This suggests the existence of additional DUBs for ERK3 whose relative functional importance may vary depending on cell types and/or cellular context. Analysis of the DUB interaction landscape has documented that several key cellular regulators interact with multiple DUBs (34). Our RNAi screen of the human DUB family also suggests that other DUBs regulate ERK3 stability. Indeed, results of co-depletion experiments indicate that USP13, one of the top hits in our screen, acts redundantly with USP20 in regulating ERK3 levels in HeLa cells. In contrast, no cooperative effect of USP16 and USP20 siRNAs was observed, suggesting that the two DUBs may act in a same pathway. Of note, HERC2, a regulator of USP20 expression and activity, has been shown to interact with USP16 and regulate its function (40). It will be interesting in future studies to investigate the individual functions of these DUBs and their redundancy with USP20.

In a previous study, we reported that ERK3 stability increases with time during myogenic differentiation of the model cell line C2C12, resulting in marked up-regulation of the protein (21). The observation that expression of USP20 is up-regulated during C2C12 differentiation, with kinetics similar to that of ERK3 accumulation, suggests that USP20 may act as a physiological regulator of ERK3 levels in skeletal muscle cells. In support of this idea, we found that overexpression of USP20 increases ERK3 protein levels in C2C12 cells. Interestingly, large-scale transcriptional profiling studies revealed that *Usp20* gene is induced during C2C12 cell differentiation as well as in mouse embryonic fibroblasts in which myogenic differentiation is induced by expression of the myogenic regulating factor MyoD

(40-42). Therefore, it is tempting to speculate that a MyoD-USP20-ERK3 signaling pathway may play a role in skeletal muscle differentiation and physiology.

Recent studies have shown that ERK3 stimulates the migration of lung and breast cancer cell lines (13, 15). In agreement with these findings, we found that ERK3 overexpression increases the migration of HeLa cells. Importantly, we showed that overexpression of USP20 phenocopies the effect of ERK3 by inducing actin cytoskeleton reorganization and promoting HeLa cell migration in an ERK3-dependent manner. Reciprocally, silencing of USP20 expression markedly inhibits MCF7 cell migration, a phenotype that is completely rescued by ectopic overexpression of ERK3. Our findings reveal novel roles of USP20 in actin cytoskeleton remodeling and cell migration and demonstrate the epistatic relationship of USP20 and ERK3 in regulating these cellular responses. Together, these results reinforce the importance of protein turnover in regulating the signaling functions of ERK3. The identification of the network of DUBs and E3 ligases controlling the stability of ERK3 will help elucidate the biological functions of this atypical kinase and its possible involvement in human disease.

## 2.7 Acknowledgments

We thank S. Mader and J.F. Côté for reagents, and P-L. Tanguay and J.-P. Guégan for critical comments. S. Meloche holds the Canada Research Chair in Cellular Signaling.

## 2.8 References

1. Klinger S, Meloche S. 2012. Erk3 and Erk4, p 593-596. *In* Choi S (ed), Encyclopedia of Signaling Molecules doi:10.1007/978-1-4419-0461-4\_542. Springer New York, New York, NY.
2. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663-75.

3. Turgeon B, Saba-El-Leil MK, Meloche S. 2000. Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa. *Biochem J* 346 Pt 1:169-75.
4. Rousseau J, Klinger S, Rachalski A, Turgeon B, Deleris P, Vigneault E, Poirier-Heon JF, Davoli MA, Mechawar N, El Mestikawy S, Cermakian N, Meloche S. 2010. Targeted inactivation of Mapk4 in mice reveals specific nonredundant functions of Erk3/Erk4 subfamily mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 30:5752-63.
5. Schumacher S, Laass K, Kant S, Shi Y, Visel A, Gruber AD, Kotlyarov A, Gaestel M. 2004. Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *EMBO J* 23:4770-9.
6. Seternes OM, Mikalsen T, Johansen B, Michaelsen E, Armstrong CG, Morrice NA, Turgeon B, Meloche S, Moens U, Keyse SM. 2004. Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *EMBO J* 23:4780-91.
7. Aberg E, Perander M, Johansen B, Julien C, Meloche S, Keyse SM, Seternes OM. 2006. Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J Biol Chem* 281:35499-510.
8. Kant S, Schumacher S, Singh MK, Kispert A, Kotlyarov A, Gaestel M. 2006. Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem* 281:35511-9.
9. Klinger S, Turgeon B, Levesque K, Wood GA, Aagaard-Tillery KM, Meloche S. 2009. Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16710-5.
10. Marquis M, Daudelin JF, Boulet S, Sirois J, Crain K, Mathien S, Turgeon B, Rousseau J, Meloche S, Labrecque N. 2014. The catalytic activity of the mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 3 is required to sustain CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocyte survival. *Mol Cell Biol* 34:3374-87.
11. Sirois J, Daudelin JF, Boulet S, Marquis M, Meloche S, Labrecque N. 2015. The atypical MAPK ERK3 controls positive selection of thymocytes. *Immunology* 145:161-9.
12. Cuevas Guaman M, Sbrana E, Shope C, Showalter L, Hu M, Meloche S, Aagaard K. 2014. Administration of antenatal glucocorticoids and postnatal surfactant ameliorates respiratory distress syndrome-associated neonatal lethality in Erk3(-/-) mouse pups. *Pediatr Res* 76:24-32.
13. Long W, Foulds CE, Qin J, Liu J, Ding C, Lonard DM, Solis LM, Wistuba, II, Qin J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 2012. ERK3 signals through SRC-3 coactivator to promote human lung cancer cell invasion. *J Clin Invest* 122:1869-80.
14. Wang W, Bian K, Vallabhaneni S, Zhang B, Wu RC, O'Malley BW, Long W. 2014. ERK3 promotes endothelial cell functions by upregulating SRC-3/SP1-mediated VEGFR2 expression. *J Cell Physiol* 229:1529-37.
15. Al-Mahdi R, Babteen N, Thillai K, Holt M, Johansen B, Wetting HL, Seternes OM, Wells CM. 2015. A novel role for atypical MAPK kinase ERK3 in regulating breast cancer cell morphology and migration. *Cell Adh Migr* 9:483-94.
16. Bian K, Muppani NR, Elkhadragy L, Wang W, Zhang C, Chen T, Jung S, Seternes OM, Long W. 2016. ERK3 regulates TDP2-mediated DNA damage response and chemoresistance in lung cancer cells. *Oncotarget* 7:6665-75.

17. Deleris P, Rousseau J, Coulombe P, Rodier G, Tanguay PL, Meloche S. 2008. Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5. *J Cell Physiol* 217:778-88.
18. Perander M, Aberg E, Johansen B, Dreyer B, Guldvik IJ, Outzen H, Keyse SM, Seternes OM. 2008. The Ser(186) phospho-acceptor site within ERK4 is essential for its ability to interact with and activate PRAK/MK5. *Biochem J* 411:613-22.
19. Deleris P, Trost M, Topisirovic I, Tanguay PL, Borden KL, Thibault P, Meloche S. 2011. Activation Loop Phosphorylation of ERK3/ERK4 by Group I p21-activated Kinases (PAKs) Defines a Novel PAK-ERK3/4-MAPK-activated Protein Kinase 5 Signaling Pathway. *J Biol Chem* 286:6470-8.
20. De la Mota-Peynado A, Chernoff J, Beeser A. 2011. Identification of the atypical MAPK Erk3 as a novel substrate for p21-activated kinase (Pak) activity. *J Biol Chem* 286:13603-11.
21. Coulombe P, Rodier G, Pelletier S, Pellerin J, Meloche S. 2003. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* 23:4542-58.
22. Tanguay PL, Rodier G, Meloche S. 2010. C-terminal domain phosphorylation of ERK3 controlled by Cdk1 and Cdc14 regulates its stability in mitosis. *Biochem J* 428:103-11.
23. Li Z, Na X, Wang D, Schoen SR, Messing EM, Wu G. 2002. Ubiquitination of a novel deubiquitinating enzyme requires direct binding to von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 277:4656-62.
24. Li Z, Wang D, Na X, Schoen SR, Messing EM, Wu G. 2002. Identification of a deubiquitinating enzyme subfamily as substrates of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun* 294:700-9.
25. Li Z, Wang D, Messing EM, Wu G. 2005. VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1 $\alpha$ . *EMBO Rep* 6:373-8.
26. Shanmugam I, Abbas M, Ayoub F, Mirabal S, Bsaili M, Caulder EK, Weinstock DM, Tomkinson AE, Hromas R, Shaheen M. 2014. Ubiquitin-specific peptidase 20 regulates Rad17 stability, checkpoint kinase 1 phosphorylation and DNA repair by homologous recombination. *J Biol Chem* 289:22739-48.
27. Yuan J, Luo K, Deng M, Li Y, Yin P, Gao B, Fang Y, Wu P, Liu T, Lou Z. 2014. HERC2-USP20 axis regulates DNA damage checkpoint through Claspin. *Nucleic Acids Res* 42:13110-21.
28. Zhu M, Zhao H, Liao J, Xu X. 2014. HERC2/USP20 coordinates CHK1 activation by modulating CLASPIN stability. *Nucleic Acids Res* 42:13074-81.
29. Anckar J, Bonni A. 2015. Regulation of neuronal morphogenesis and positioning by ubiquitin-specific proteases in the cerebellum. *PLoS One* 10:e0117076.
30. Coulombe P, Rodier G, Bonneil E, Thibault P, Meloche S. 2004. N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* 24:6140-50.
31. Rodier G, Montagnoli A, Di Marcotullio L, Coulombe P, Draetta GF, Pagano M, Meloche S. 2001. p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *EMBO J* 20:6672-82.



32. Servant MJ, Coulombe P, Turgeon B, Meloche S. 2000. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* 148:543-56.
33. Voisin L, Saba-El-Leil MK, Julien C, Fremin C, Meloche S. 2010. Genetic demonstration of a redundant role of extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 mitogen-activated protein kinases in promoting fibroblast proliferation. *Mol Cell Biol* 30:2918-32.
34. Sowa ME, Bennett EJ, Gygi SP, Harper JW. 2009. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell* 138:389-403.
35. Brand F. 2012. Regulation and Function of ERK3/MK5-mediated Signaling. Phd thesis. Hannover Medical School, Hannover, Germany.
36. Sun M, Wei Y, Yao L, Xie J, Chen X, Wang H, Jiang J, Gu J. 2006. Identification of extracellular signal-regulated kinase 3 as a new interaction partner of cyclin D3. *Biochem Biophys Res Commun* 340:209-14.
37. Hansen CA, Bartek J, Jensen S. 2008. A functional link between the human cell cycle-regulatory phosphatase Cdc14A and the atypical mitogen-activated kinase Erk3. *Cell Cycle* 7:325-34.
38. Brand F, Schumacher S, Kant S, Menon MB, Simon R, Turgeon B, Britsch S, Meloche S, Gaestel M, Kotlyarov A. 2012. The extracellular signal-regulated kinase 3 (mitogen-activated protein kinase 6 [MAPK6])-MAPK-activated protein kinase 5 signaling complex regulates septin function and dendrite morphology. *Mol Cell Biol* 32:2467-78.
39. Yen HC, Xu Q, Chou DM, Zhao Z, Elledge SJ. 2008. Global protein stability profiling in mammalian cells. *Science* 322:918-23.
40. Zhang Z, Yang H, Wang H. 2014. The histone H2A deubiquitinase USP16 interacts with HERC2 and fine-tunes cellular response to DNA damage. *J Biol Chem* 289:32883-94.
41. Cao Y, Kumar RM, Penn BH, Berkes CA, Kooperberg C, Boyer LA, Young RA, Tapscott SJ. 2006. Global and gene-specific analyses show distinct roles for Myod and Myog at a common set of promoters. *EMBO J* 25:502-11.
42. Di Padova M, Caretti G, Zhao P, Hoffman EP, Sartorelli V. 2007. MyoD acetylation influences temporal patterns of skeletal muscle gene expression. *J Biol Chem* 282:37650-9.
43. Rajan S, Chu Pham Dang H, Djambazian H, Zuzan H, Fedyshyn Y, Ketela T, Moffat J, Hudson TJ, Sladek R. 2012. Analysis of early C2C12 myogenesis identifies stably and differentially expressed transcriptional regulators whose knock-down inhibits myoblast differentiation. *Physiol Genomics* 44:183-97.

## **CHAPITRE III – Article 2 : A Functional Screen Targeting Ubiquitination Enzymes Identify the E3 Ligase E6AP as a Regulator of ERK3 Ubiquitination and Degradation.**

### **3.1 Mise en situation**

Cette deuxième étude a pour objectif d'identifier les E2 conjuguases et les E3 ligases qui régulent négativement la stabilité de ERK3. Nous avons développé un système rapporteur basé sur l'action d'une protéine de fusion à activité luciférase pour pouvoir quantifier les niveaux d'expression de la protéine ERK3 d'une manière utilisable pour des expériences à haut débit. Nous avons ensuite réalisé un crible de RNAi et identifié des régulateurs potentiels de ERK3. Nous avons ensuite confirmé l'ubiquitine ligase E6AP comme un régulateur de ERK3 et caractérisé les interactions moléculaires entre les deux protéines.

J'ai conçu et réalisé l'intégralité des expériences présentées dans cet article sous la supervision de Sylvain Meloche. Les étapes de criblage ont été réalisées en collaboration avec la plateforme de criblage à haut débit de l'Institut de recherche en immunologie et oncologie de l'Université de Montréal. J'ai réalisé l'ensemble de l'analyse des résultats et écrit le manuscrit présenté ci-après.

La préparation de cet article est terminée, il sera soumis pour publication sous peu.

**A Functional Screen Targeting Ubiquitination Enzymes Identify the E3 Ligase E6AP as a Regulator of ERK3 Ubiquitination and Degradation.**

**Simon Mathien<sup>ab</sup> and Sylvain Meloche<sup>abc#</sup>**

Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie<sup>a</sup>; Departments of Molecular Biology<sup>b</sup> and Pharmacology<sup>c</sup>, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

# Corresponding author: Dr Sylvain Meloche, [sylvain.meloche@umontreal.ca](mailto:sylvain.meloche@umontreal.ca)

## 3.2 Abstract

ERK3 is a poorly characterized atypical MAP kinase, which displays unique structural and regulatory properties. Unlike classical MAP kinases that switch between an on and off state by phosphorylation of their activation loop, ERK3 is constitutively activated in various cellular settings. However, ERK3 is a highly unstable protein, subjected to a dynamic and coordinated regulation by the ubiquitine-proteasome system (UPS), notably during cell differentiation and cell cycle progression. Protein turnover exerts a major regulatory impact on ERK3 biological activity, which distinguishes ERK3 from other MAP kinase family members. To understand this novel and unique mode of MAP kinase regulation, we aimed to identify the network of UPS components that controls ERK3 protein turnover. We used an RNAi approach using sub-genomic libraries targeting E3 ligase and E2 conjugase genes. From this large-scale approach, we identified networks of E3s and E2s regulating ERK3 stability and protein expression. Most notably we identified the E3 ligase E6AP and associated E2 conjugases. We validated that E6AP is a *bona fide* regulator of ERK3 expression and stability that interacts with and regulates ERK3 ubiquitination levels. In conclusion, our results identified a network of UPS components centered on E6AP that is responsible for a unique mode of control of a MAP kinase expression.

## 3.3 Introduction

Extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3), along with its paralogous kinase ERK4, forms a distinct subfamily of poorly characterized atypical MAP kinases (MAPK). Structural and functional features distinguish ERK3/ERK4 from classical MAP kinases. ERK3 and ERK4 possess a single phosphor-acceptor site (Ser-Glu-Gly) in their activation loop rather than the conserved Thr-Xaa-Tyr motif, suggesting that they are poor substrate for dual-specificity MAPK kinase family members (1, 2). In contrast to classical MAP kinases that phosphorylate numerous targets, only a few substrates of ERK3/ERK4 have been

characterized to date, notably the MAP kinase-activated protein kinase MK5 (3, 4). Hence, the physiological and cellular functions of ERK3 and ERK4 are still poorly understood. Yet, studies suggest that ERK3 plays key roles in embryonic development and differentiation, cell adhesion, cell migration and DNA-damage response (5-10).

The activity of MAP Kinases is mainly regulated by activating phosphorylation (11). We and others have recently shown that ERK3 and ERK4 are phosphorylated on their activation loop by Group I p21 activated kinases (PAK) kinases (12, 13), which stimulate ERK3 and ERK4 intrinsic kinase activity and affinity for their substrate MK5 (14). Nonetheless, phosphorylation of ERK3 and ERK4 activation loop is constitutive in resting cells and is not modulated by classical MAPK stimuli such as growth factors and cellular stress (14). Therefore, the physiological relevance of activating phosphorylation as a control of ERK3 signaling in cells is still unclear.

ERK3 is a highly unstable protein, with a half-life of 30–60 minutes (min), constitutively degraded by the ubiquitin-proteasome system (UPS) in proliferating cells (15). Contrary to most substrates for which ubiquitin are conjugated on internal lysines, ERK3 is ubiquitinated on the  $\alpha$ -amino group of its N-terminus (16). ERK3 protein turnover is modulated in several physiological contexts. Notably, ERK3 is stabilized and accumulates with time during cellular differentiation of myogenic and neurogenic precursors (15). Furthermore, CDK1-dependent phosphorylation of ERK3 on its C-terminal extension leads to its transient accumulation in mitosis as a result of protein stabilization (17). These observations suggest that protein turnover might be a critical regulator of ERK3 signaling.

The components of the ubiquitin-proteasome system that control ERK3 stability and degradation are still poorly characterized. We recently identified the ubiquitin specific protease USP20 as a *bona fide* deubiquitinase of ERK3 (18). However, the components of the ubiquitination machinery that control ERK3 polyubiquitination and subsequent degradation remain to be identified. In this study, we performed a RNAi screen of human E3 ligases and E2 conjugases families using the Nano Luciferase (NLuc) fusion protein reporter system to identify regulators of ERK3 stability. We identified the HECT-type E3 ligase E6AP (also

known as UBE3A) and multiple associated E2 conjugases as putative regulators of ERK3. E6AP was the first identified mammalian ubiquitin ligase, and is the founding member of the HECT (Homologous to E6AP C terminus) family of ubiquitin ligases. It was first identified as a binding partner of the Human Papillomavirus E6 protein and inducer of ubiquitination and degradation of the tumor suppressor p53 (19). Subsequent studies have shown that E6AP loss of functions, by mutation or imprinting, induces Angelman syndrome, a human neurodevelopmental disorder that includes microcephaly, seizures, EEG abnormalities, and hyperactivity (20-22). E6AP has also been proposed to regulate several cellular functions such as estrogen receptor signaling (23), neuron morphogenesis (24), and breast cancer cell migration and metastasis (25). In this study, we report that E6AP is regulator of ERK3 protein expression by regulating its stability and showed that E6AP interacts with and regulate the ubiquitination levels of ERK3.

### **3.4 Material and methods**

#### **Reagents and antibodies**

Furimazine, a specific substrate for Nanoluciferase was purchased from Promega. Cycloheximide, N-ethylmaleimide (NEM) and Bortezomib were from Sigma. MG132 was from UBPBio and MLN4924 from Cayman chemicals. SMARTpool siRNAs targeted to CUL4A and DDB1 were obtained from Dharmacon. Commercial antibodies were from the following sources: anti-ERK3 (EP1720Y) from Abcam; anti-HSC70 (sc-7298) and anti-HA (sc-805) from Santa Cruz Biotechnology.

#### **Plasmid constructs**

The plasmids pcDNA3-Myc<sub>6</sub>-ERK3 has been previously described (15, 16). pLenti6-NLuc was generated by subcloning the insert from pNL-[Nluc] (Promega) into pLenti6 empty vector. pLenti6-ERK3-NLuc was generated by subcloning the insert from pLenti6-Myc<sub>6</sub>-ERK3 into pLenti6-NLuc. p3868 HA-E6AP wild-type (WT) and C833A dominant negative mutant (DN) were a gift from Peter Howley (Addgene plasmid # 8648 and #8649).

#### **Cell culture, transfections and lentiviral infections**

293T and HeLa cells were obtained from American Tissue Culture Collection. The cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. 293T cells and HeLa cells were transiently transfected using polyethylenimine and Lipofectamine 3000 (Invitrogen) respectively following manufacturer's protocol. For siRNA transfections, the cells were transfected with RNAiMAX (Invitrogen) per the manufacturer's instructions. For lentiviral infections, 293T cells were transfected with pMD2/VSVG, pMDLg/pRRE, pRSV/Rev and pLenti6-NLuc or pLenti6-ERK3-NLuc. After 48 h, virus-containing culture media were filtered and used to infect HeLa cells. Polyclonal populations of infected cells were obtained by selection with blasticidin (Sigma).

### **Nanoluciferase bioluminescence assay**

For NanoLuc luciferase assay, HeLa expressing ERK3-NLuc or NLuc were seeded in white 96-well plates. After 24h, growing medium was replaced by Furimazine diluted in PBS and bioluminescence then measured on a Synergy Neo2 Multi-Mode Reader. PrestoBlue cell viability reagent was then added to each well, incubated for 10 min and fluorescence was measured on a Synergy Neo2 plate reader per the manufacturer's instructions.

### **shRNA screen**

For shRNA screens, we used lentivirus clones generated Mission<sup>TM</sup> TRC1 shRNA SIGMA library with an average titre of  $5 \times 10^6$  particles/mL. Stable cell line expressing ERK3-NLuc were seeded in white 96 wells plates and transduced with lentiviral particles. 48h after transduction, positive controls were added for 24h and luminescence was measured as described in "Nanoluciferase bioluminescence assay".

### **Interaction network analysis**

To generate E3/E2 protein interaction network, we used the STRING database with all our screen hits as input. We selected high confidence interaction retrieved from experiments. We then filtered for E3/E2 interactions and for RING-E3 or HECT-E3. We added high-confidence interaction from yeast-two hybrid studies (26-28). We then used Cytoscape software to build the networks. For GO analysis, we used the Cytoscape plugin BiNGO (29).

### **Immunoblotting and immunoprecipitation**

Cell lysis, immunoprecipitation, cycloheximide-chase experiments and immunoblot analysis were performed as described (15, 16). For immunoprecipitation experiments, 500 µg lysate proteins were incubated with the indicated antibodies for 2-4 h at 4°C. For cycloheximide-chase experiments, protein levels were quantified by densitometry analysis of immunoblotting data. ERK3 half-life was estimated by one-phase decay curve fitting.

### **Ubiquitination assays**

For *in vivo* ubiquitination assays, 293T cells were transfected with expression vectors for HA-ERK3-GST, HA-ubiquitin and HA-E6AP WT or DN. After 48 h, the cells were treated with 20 µM of the proteasome inhibitor MG132 for 16 h. The cells were lysed in lysis buffer supplemented with 10 mM *N*-ethylmaleimide (Sigma). Cell lysates (750 µg of protein) were then incubated for 2 h at 4°C with 20 µl of glutathione-agarose resin. Bound proteins were washed four times in lysis buffer and resolved by SDS-PAGE. Ubiquitin-containing conjugates were detected by immunoblotting with anti-HA antibody.

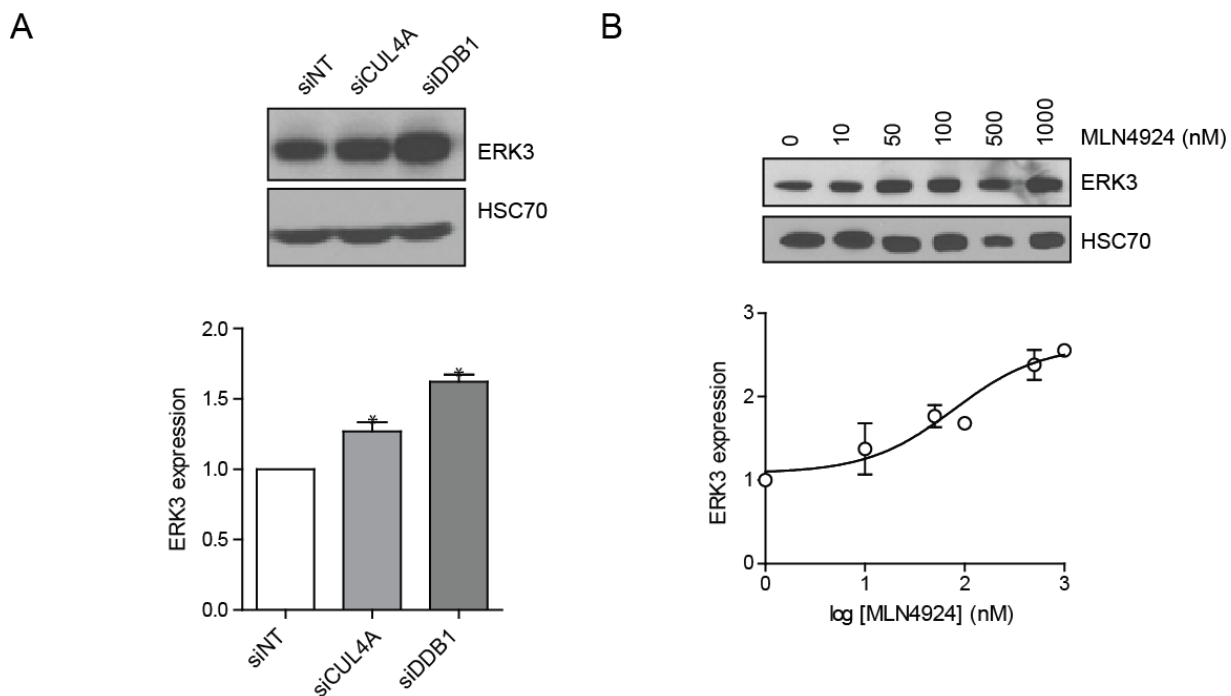
## **3.5 Results**

### **3.5.1 ERK3 is accumulated in response to inhibition of CRL4 ubiquitin ligase complexes.**

ERK3 has been identified as a putative substrate of CRL4 ubiquitin ligase complexes in a genome wide study (30). In these experiments, inhibition of CRL4 complexes by a dominant negative (DN) form of Cullin4 induces an increase in the stability of an N-terminally tagged ERK3, measured by the GPS system. We therefore wanted to assess the effect of CRL4 loss of function on ERK3 expression, as a proof that inhibition of a subtype of ubiquitin ligase complexes induces an increase in ERK3 abundance. We first used SMARTpool siRNAs to deplete CUL4A and DDB1 in HeLa cells and monitored ERK3 expression by immunoblot



analysis. Efficiency of the siRNAs was measured by qPCR and was respectively of 64 and 71% inhibition.



**Figure 1. ERK3 accumulation in response to CRL4 ubiquitin ligases inhibition.**

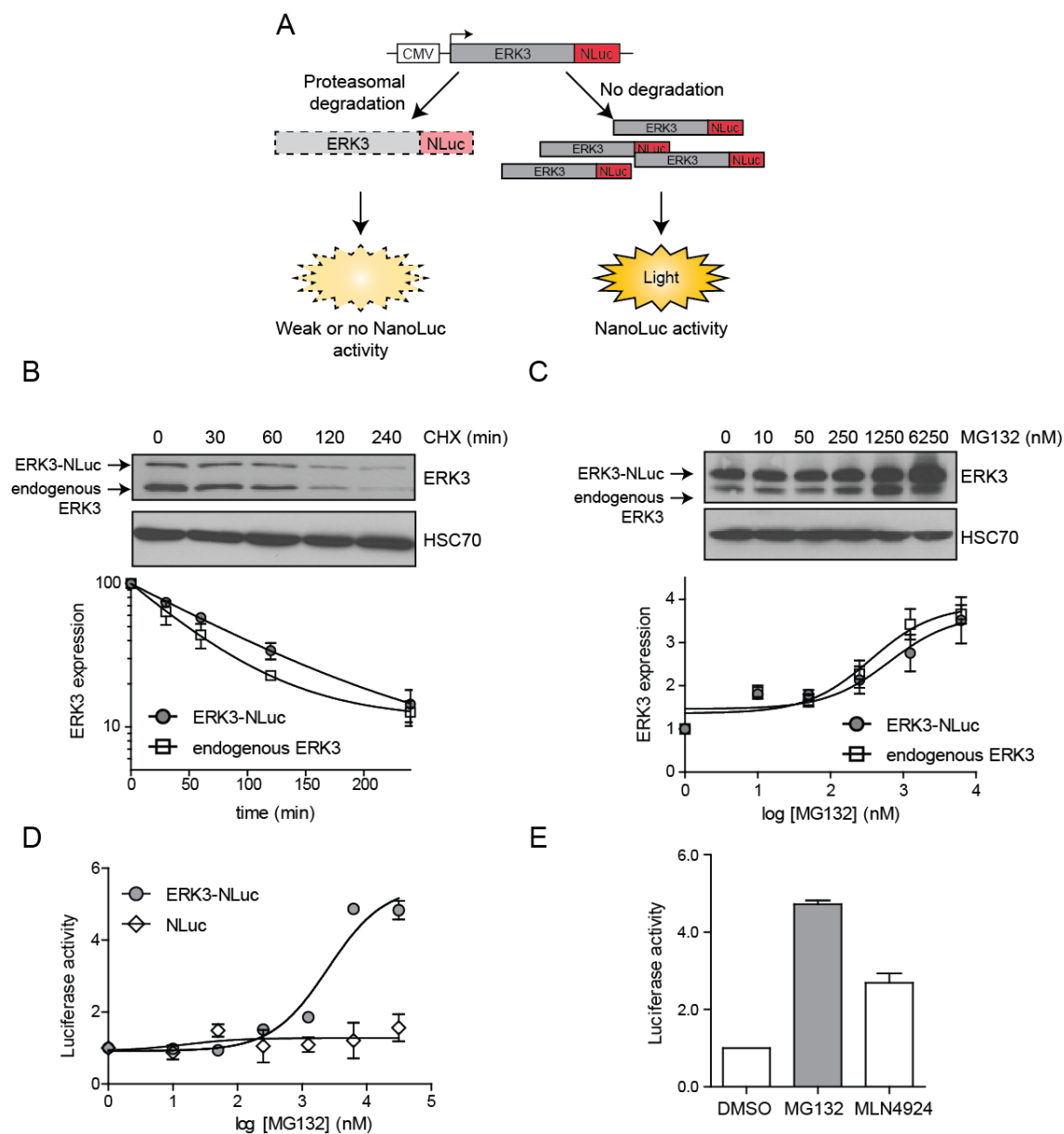
(A) HeLa cells were transfected with indicated SMARTpool siRNAs. After 48h, cells were lysed and analyzed by immunoblotting with anti-ERK3 antibody and anti-HSC70 as a loading control. Upper panel, representative blot. Lower panel, quantification of ERK3 expression was performed on three independent experiments. (B) HeLa cells were treated with concentrations of MLN4924 for 8h. Expression of ERK3 was analyzed by immunoblotting as described in A. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical significance was determined by two-way ANOVA with Bonferroni post-test using Graph Pad Prism Software version 5. (\* $P < 0.05$ )

Silencing of both components of the complex slightly increased ERK3 protein expression (Fig. 1A). We then tested the accumulation of ERK3 in response to treatment with MLN4924, a chemical inhibitor of NEDD8-Activating Enzyme, and an indirect inhibitor of CRL by blocking cullin neddylation. MLN4924 induced a 2.5-fold increase of ERK3 protein expression, with an  $EC_{50}$  of 78 nM, consistent with the involvement of a CRL complex (31). These results indicate that inhibition of a subfamily of RING-type E3 ligases leads to a measurable accumulation of ERK3, validating the relevance of screening for specific E2 and E3 regulators of ERK3.

### **3.5.2 Development of a ERK3-NanoLuc reporter system to identify regulators of ERK3 protein in cells.**

We developed a reporter system to assess the turnover of ERK3 protein in cells. We used NanoLuc, an engineered small (19 kDa) luciferase subunit that produces stable luminescence with high brightness (32). We generated a fusion protein by cloning the cDNA of full length ERK3 in an expression vector in frame with Nanoluciferase (hereafter ERK3-NLuc), under control of the CMV promoter. The aim of our ERK3-NLuc system is to measure regulations of ERK3 turnover and protein abundance by measuring the luminescence generated by the fusion protein upon transfection or lentiviral transduction in cells (fig. 2A). We first confirmed that the ERK3-NLuc fusion protein is regulated as the endogenous ERK3. We measured the half-life of endogenous and Nanoluciferase tagged-ERK3 by cycloheximide chase experiments. Both proteins had comparable half-lives of respectively 45 and 65 minutes ( $\pm 20$  and 14 min), calculated (Fig. 2B). We also tested the accumulation of ERK3-NLuc and endogenous ERK3 in response to proteasome inhibition. Treatment with increasing amounts of MG132 induced a similar accumulation of both proteins (Fig. 2C). We then assessed the ability of ERK3-NLuc to induce luciferase activity reflecting the accumulation of the protein. We treated cells with MG132 and performed luciferase assay followed by PrestoBlue cell viability assay for normalization. MG132 induced an increase of 4.8-fold of the measured luminescence with an  $EC_{50}$  of 2.5  $\mu$ M and (Fig. 2D), in the same range with the  $EC_{50}$  of 0.7  $\mu$ M measured by western blot analysis (Fig. 2C). In contrast, we were not able to detect an increase of luciferase activity in cells expressing the Nanoluciferase alone (Fig. 2D). Finally, we compared the induction of ERK3-NLuc signal generated by inhibition of CRL E3 ligases complexes and inhibition of the proteasome. We treated cells with MG132 or MLN4924 and performed luciferase assay. Consistent with previous results, we measured an increase of luminescence by 4.5-fold for MG132 and 2.6-fold for MLN4924 (Fig. 2D). Therefore, proteasome inhibition is a more potent inducer of ERK3 accumulation and was chosen as a positive control for the rest of our study. Taken together, these results demonstrate that the activity of ERK3-NLuc reflects the abundance of endogenous ERK3 and thus is a proper experimental system to assess the regulations of ERK3 turnover.



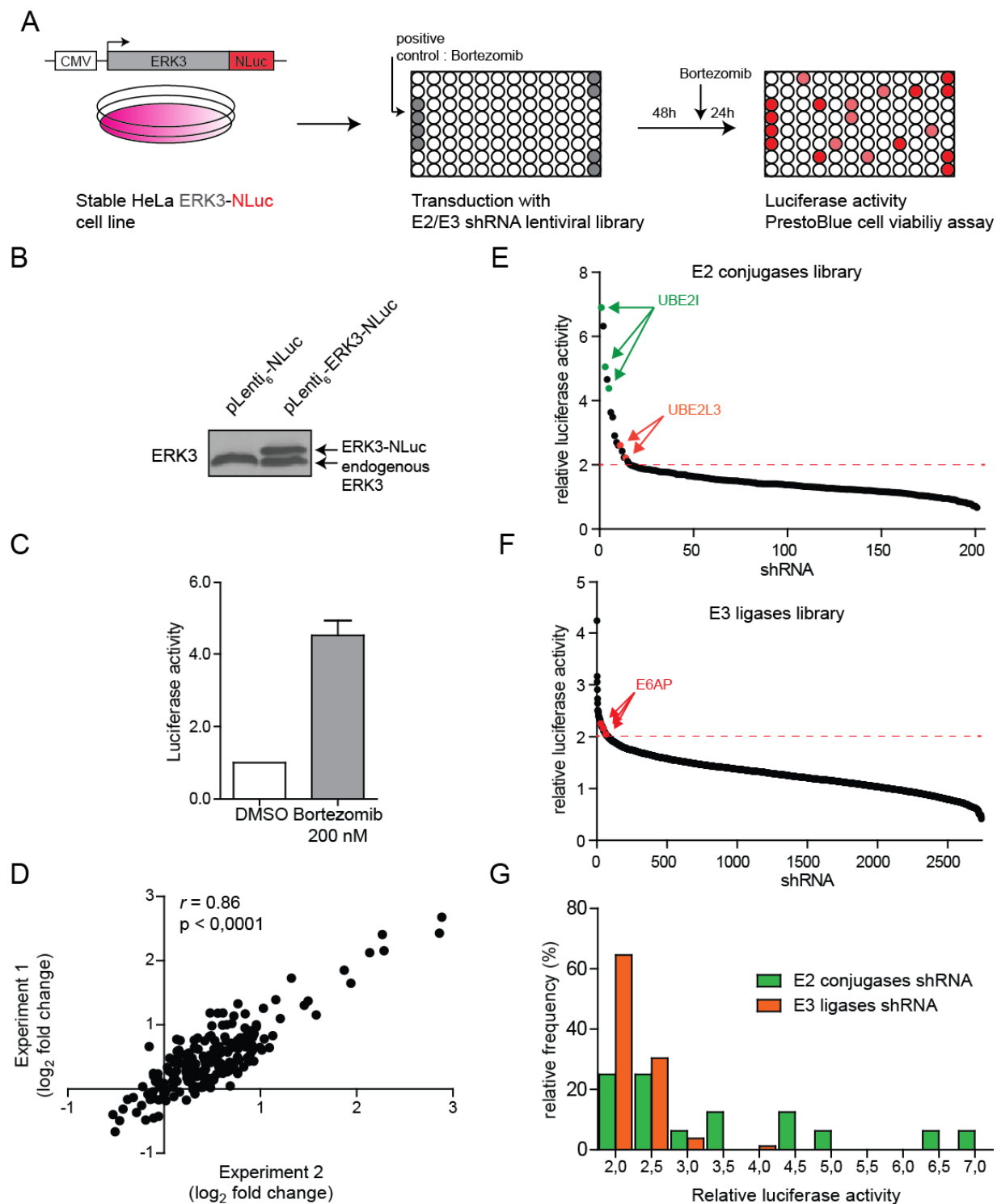


**Figure 2. The ERK3-NLuc reporter system.**

(A) Scheme representing the functioning of the ERK3-NLuc reporter system (B,C) HeLa cells were transiently transfected with pLenti<sub>6</sub>-ERK3-NLuc. After 36h, the cells were treated with 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  cycloheximide (CHX) for the indicated times (B) or treated with MG132 at indicated concentration for 6h (C). Levels of both endogenous (lower band – MW = 97 kDa) and Nano-luciferase (higher band – MW  $\approx$  120 kDa) were analyzed by immunoblotting. Top panels, a representative blot is shown. Bottom panels, quantification of immunoblotting data performed on three independent experiments. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of relative ERK3 expression normalized respectively to 0 min time point and 0 nM MG132. Degradation curves were fitted to a one-phase decay model. (D) HeLa cells were transfected with pLenti<sub>6</sub>-ERK3-NLuc or pLenti<sub>6</sub>-NLuc as indicated. 36h after transfection, cells were seeded in 96 well plates and treated with indicated concentration of MG132 for 6h. Luciferase activity was assessed by measuring luminescence and normalized for cell viability with PrestoBlue fluorescence assay. (E) HeLa cells were treated with 5  $\mu\text{M}$  MG132 or 200 nM MLN4924 for 6h and ERK3-NLuc activity monitored as in (D). Results are expressed as mean  $\pm$  SD of relative ERK3-NLuc activity.

### **3.5.3 Functional RNAi screen for ubiquitin ligases and ubiquitin conjugases identifies several candidates for regulation of ERK3 turnover.**

We used the ERK3-NLuc reporter system in an shRNA screen to identify E3 ligases and E2 conjugases that regulate ERK3 protein levels (Fig. 3A). We first generated stable HeLa cell lines expressing ERK3-NLuc, and selected one with ERK3-NLuc expression levels equivalent to endogenous ERK3 (Fig. 3B). We chose Bortezomib, a chemical inhibitor of the proteasome, as a positive control for the screen as it induces a 4.5-fold induction of ERK3-NLuc luciferase activity. The induction was similar to MG132, yet with less variability (calculated  $Z'$  of 0.55 for Bortezomib vs 0.35 for MG132) (Fig. 2C and data not shown). We then proceed to genome-scale RNAi screens of the human E2 and E3 families using MISSION shRNA lentiviral libraries. The E2 conjugase and E3 ligase libraries were composed of 201 and 2738 single shRNA respectively, which target 39 E2 and 561 E3 human genes (mean of 5 shRNA/gene). Comparison of the results for two independent screening experiments with the E2 conjugase library showed a strong and significant correlation (Pearson's  $r = 0.86$ ), implying that RNAi screens performed with this system are highly reproducible (Fig. 3D). We determined a cut-off rate of two-fold increase in ERK3-Luc activity compared to non-target shRNA, which lies in the same range as the accumulation of endogenous ERK3 protein observed in figure 1 for the inhibition of CRL4 complexes. Using this threshold, we identified 16 single shRNA, targeting 13 different E2 conjugases, as regulators of ERK3 (Fig. 3E). Among these genes, only the SUMO conjugase UBE2I (Ubc9) and the ubiquitin conjugase UBE2L3 (UBCH7) had more than one shRNA inducing a two-fold increase of ERK3-NLuc activity (Fig. 3E). With the E3 ligase lentiviral library, we identified 79 single shRNA, targeting 71 E3 ligases that induces ERK3 reporter activity (Fig. 3F), including 7 E3 ligases with two different shRNAs reaching our criteria. The E3 ligase E6AP (UBE3A) was the single gene targeted by three shRNAs inducing a more than two-fold increase of ERK3-NLuc activity (Fig. 3F). Since a single E2 acts with multiple E3, we observed, as expected, a greater accumulation of ERK3 protein by silencing E2 conjugases. Indeed, approximately 60% of the identified shRNA targeting E3 ligases induced only a moderate ERK3 stabilisation (between 2.0 and 2.5-fold) compared to control (Fig. 3G).

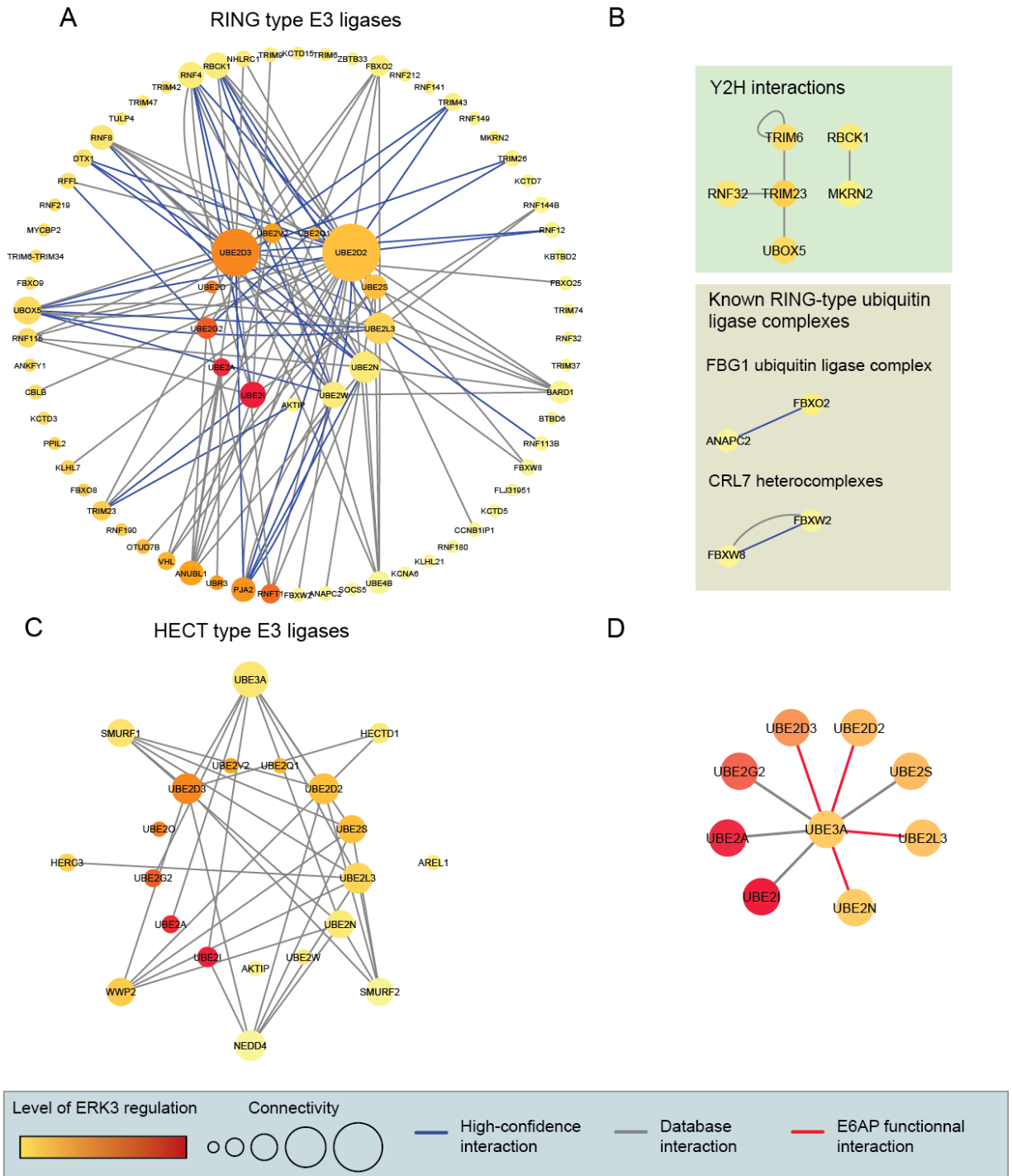


**Figure 3. Summary of the shRNA screen to identify E2 conjugases and E3 ligases regulators of ERK3 turnover.**

(A) Outline of the workflow of the shRNA screen in HeLa cells. (B) HeLa cells were infected with indicated lentivirus vectors and selected with blasticidin for 7 days. Expression of ERK3-Nluc and ERK3 was monitored by immunoblotting. (C) Stable HeLa ERK3-NLuc cells were seeded in 96-well plate and treated with 200 nM Bortezomib for 24h. Luciferase activity was assessed by measuring luminescence and normalized for cell viability with PrestoBlue fluorescence assay. (D) Reproducibility of HTS method. A scatter plot representing ERK3 accumulation fold measured in two independent experiments of E2 conjugases library shRNA screens. (E,F) Normalized data of the E2 conjugase and E3 ligase screens, expressed as the mean of two independent experimnt or single value of log2 fold change of ERK3-Nluc luciferase activity for the E2 and E3 screens respectively. The red dotted line indicates the cut-off for hit selection. (G) Frequency distribution of hits for E2 conjugases or E3-ligases.

To identify functional complexes regulating ERK3, we used the E2 conjugases and E3 ligases identified in the shRNA screen to generate protein-interaction networks using the STRING database, and high-confidence interactions collected in published yeast-two hybrid studies (26-28). We combined interactions extracted from the databases and high confidence studies to generate two networks depicting RING-type E3 ligases/E2 conjugases and HECT-type E3 ligases/E2 conjugases interactions. The E3 RING/E2 interaction network is composed of 73 nodes (13 E2 and 60 RING E3), connected by 106 E2/E3 interactions (edges) (Fig. 4A). Among the 73 putative regulators of ERK3, two E2 conjugases and 31 RING E3 ligases showed no interactions with other components of the network. We observed no correlation between the level of ERK3 regulation by a RING-E3 and its connectivity to identified E2. However, we identified some highly-connected nodes that appear to be strong regulators of ERK3 stability. This was the case for UBE2D2 (UBCH5B) and UBE2D3 (UBCH5C), two members of the UBCH5 family known to functionally interact with a wide range of both RING-type and HECT-type E3 ligases (33). Conversely, we identified robust regulators of ERK3 that had few molecular connections to other regulators of ERK3, such as the E2 enzymes UBE2A and UBE2I (Ubc9).

Most RING-type E3 ligases function as multimeric complexes (34). We therefore sought to determine if we identified subunits of functional complexes in our screen. Analysis of database and published interactions showed that several of these RING-E3 interact in high-throughput Y2H experiments (27), forming putative RING type complexes regulating ERK3 (Fig. 4B – top panel). Moreover, we identified subunits of known FBG1 and CRL7 ubiquitin ligases complexes (34, 35)(Fig. 4B – bottom panel).



**Figure 4. Networks of ERK3 regulators.** Identified regulators were overlaid on E3/E2 interaction from published Y2H studies and high-confidence interactions from the STRING database. Circles represent E3 ligases and E2 conjugases identified in the screen. Levels of ERK3 regulation is indicated by a continuous color grade, connectivity to other components of the network by continuous size scale. (A) RING-E3/E2 interactions. (B) RING-E3/RING-E3 interactions. (C) HECT-E3/E2 interactions. (D) E6AP/E2 interactions.



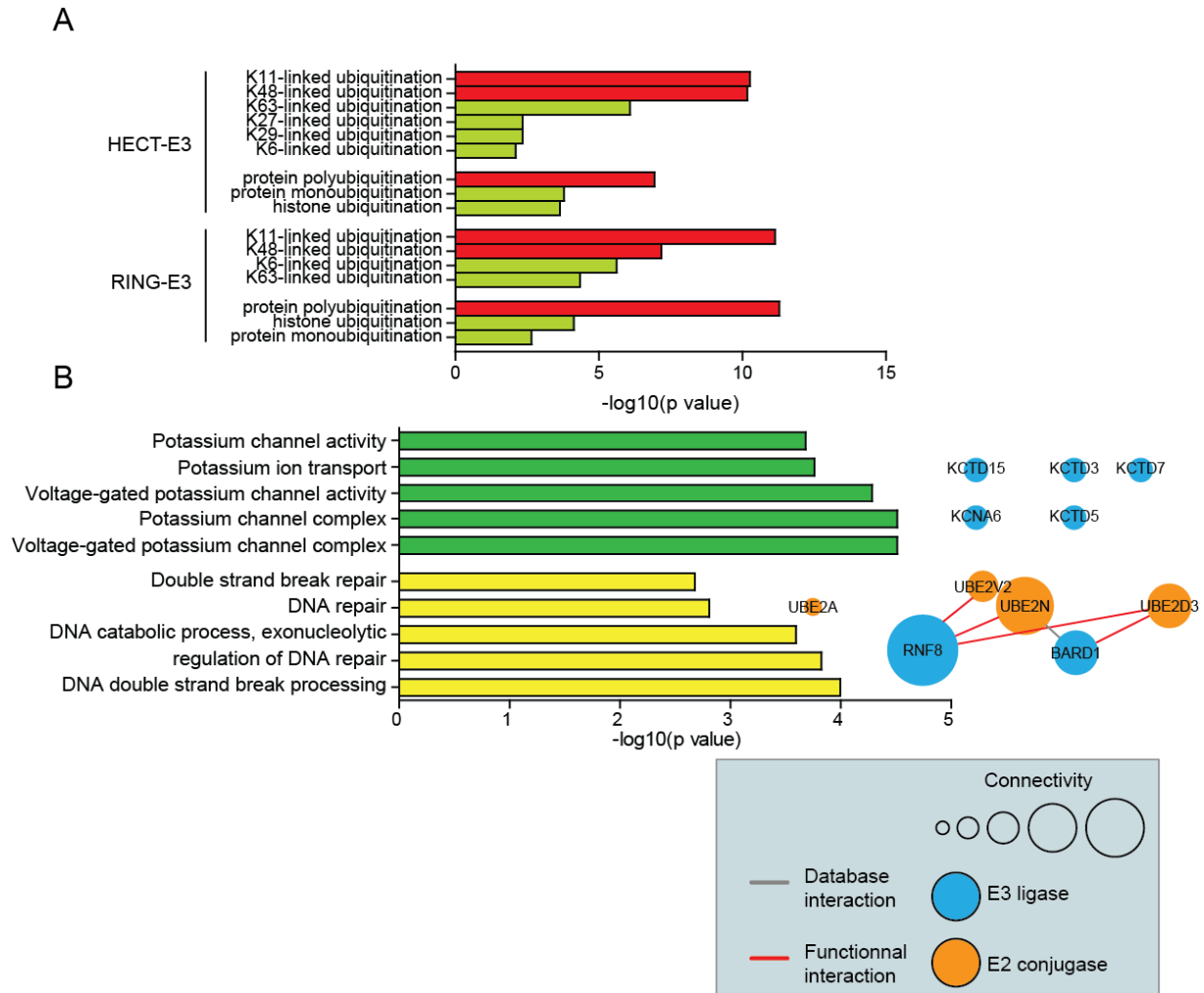
The E3 HECT/E2 interaction network is composed of 21 proteins linked by 32 E2/E3 interactions (Fig. 4C). Five E2 enzymes and one E3 ligase showed no interactions with others putative ERK3 regulators. The E3 ligase UBE3A is the most connected node of the network, interacting with 8 putative E2 conjugases of ERK3. Using curated published studies (37, 38) in addition to database information, we established a network of E6AP and E2 conjugases regulators of ERK3 (Fig. 4D). These results indicate that our screens led to the identification of four known functional E6AP-E2 conjugase complexes as regulators of ERK3.

We further characterized the putative regulators of ERK3 by performing Gene Ontology (GO) analyses on the identified genes. As expected, GO terms associated with ubiquitination were overrepresented (Fig. 5A). It is worth noting that GO terms corresponding to ubiquitination related to proteasome degradation (GO terms: protein polyubiquitination; K48- and K11-linked polyubiquitination) represented the most significant GO term enrichment.

We then filtered GO terms to exclude ubiquitination related terminology. This analysis showed an enrichment in ERK3 regulators in two clusters of GO terms, one related to potassium ( $K^+$ ) ion channel activity and the second to DNA repair (Fig. 5B). The proteins associated with the GO terms linked to  $K^+$  ion channel are mostly members of the  $K^+$  channel tetramerization domain (KCTD) family, which share sequence similarities with the cytoplasmic domain of voltage-gated  $K^+$  channels. Despite their name, KCTD proteins are not known to be involved in  $K^+$  channel activity, however the majority of the family function as adaptors for Cul3 ubiquitin ligase complexes (39). Surprisingly, we identified four members of the KCTD family as regulators of ERK3 (KCTD3, KCTD5, KCTD7 and KCTD15), but no other components of the Cul3 complexes. The second cluster of GO term identified was composed of E3 ligases and E2 conjugases with known roles in DNA repair and DNA-damage response mechanisms (Fig. 5B). Combination with E3/E2 interaction analysis described in figure 4 showed functional complexes, most notably the RNF8-UBE2V2/UBE2N (Ubc13/Mms2) complex, well characterized for its function in the repair of DNA double-strand breaks (40).

Taken together, analyses of our functional shRNA screens led to the identification of several hypothesis for the identity of ERK3 regulators: Cul3 ubiquitin ligase complexes, DNA-

damage response RNF8-UBE2V2/UBE2N complexes and HECT-type E3 ligases E6AP. The latter showed the highest confidence for functional interaction with E2 conjugases identified in our screen. Moreover, it was recently established that E6AP and ERK3 are part of the same high-molecular weight complex composed of NEURL4, HERC2, E6AP and ERK3 (41). We thus decided to further characterize the regulation of ERK3 by E6AP.



**Figure 5. Gene Ontology (GO) analysis of ERK3 regulators.**

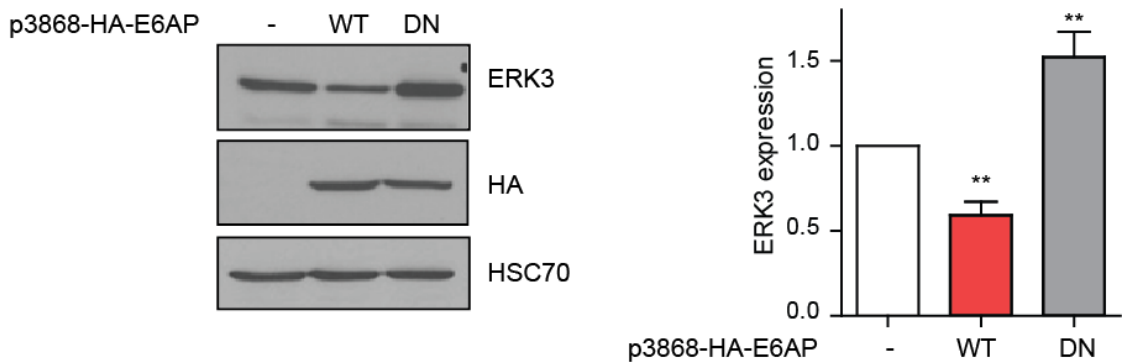
Analysis of enrichment for GO terms associated with ERK3 regulators were performed using the plugin for Cytoscape BiNGO. (A) Enrichment corrected p-value of GO terms associated to ubiquitination for HECT-E3 and RING-E3 are represented. GO terms related to pro-degradation ubiquitination are highlighted in red. (B) Two clusters of Enrichment corrected p-value of GO terms non-associated to ubiquitination for RING-E3 are represented. Network of ERK3 regulators associated with selected GO terms are represented.

### **3.5.4 E6AP regulates ERK3 protein levels by decreasing its stability**

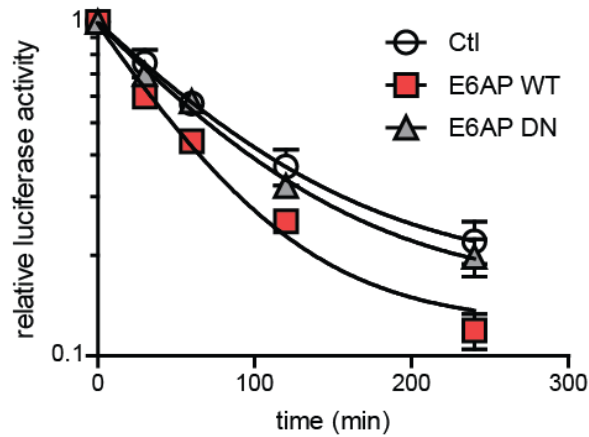
To confirm whether E6AP is a regulator of ERK3, we examined the effect of ectopic overexpression of E6AP on ERK3 protein abundance in 293T cells. Expression of a WT E6AP induced a two-fold decrease of ERK3 protein level (Fig. 6A). Interestingly, this effect is dependent on the catalytic activity of E6AP, as an inactive mutant did not induce this effect. Moreover, overexpression of this mutant, which acts as a dominant negative (DN) form of the protein, induced a significant increase in the abundance of ERK3 protein (Fig 6A). In accordance with our shRNA screen, this result confirms by an independent approach that inhibition of E6AP activity induces an increase of ERK3 protein level in cells.

We further assessed the impact of E6AP on the stability of ERK3 by measuring the half-life of the ERK3-NLuc reporter system measured by cycloheximide-chase experiments. Overexpression of E6AP WT shortened the half-life of ERK3 whereas overexpression of E6AP DN had no measurable effect on the half-life of ERK3 (Fig, 6B). We concluded from these results that E6AP regulates ERK3 protein expression by decreasing its stability.

A



B



**Figure 6. The E3 ligase E6AP regulates ERK3 protein levels by promoting its degradation.**

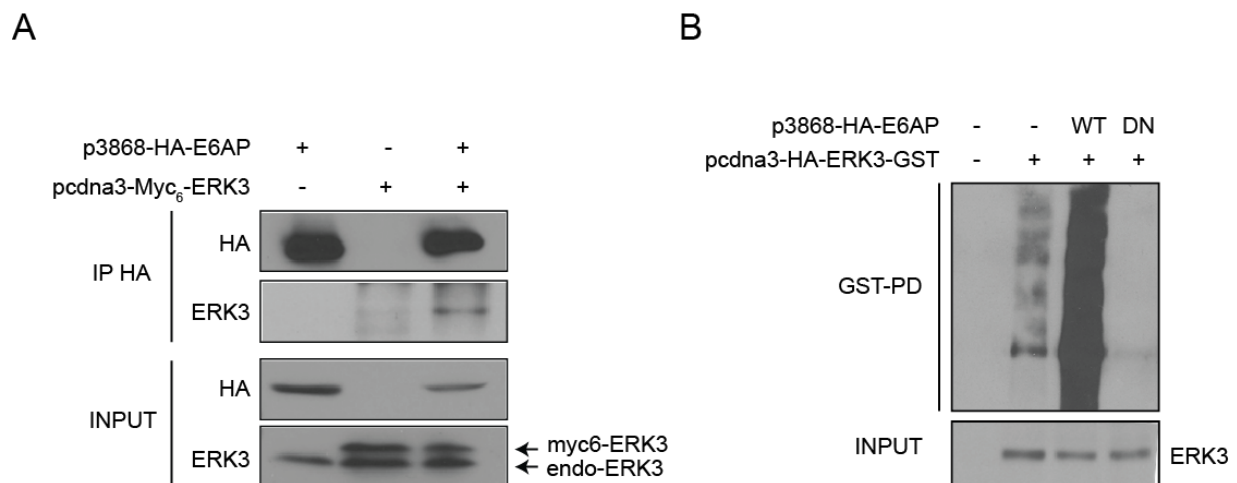
(A) 293T cells were transiently transfected with HA-E6AP WT or DN for 36h. ERK3 expression levels were analyzed by immunoblotting. Exogenous E6AP expression levels were analyzed by anti-HA immunoblotting. Left panels, a representative blot is shown. Right panels, quantification of immunoblotting data performed on three independent experiments. (B) HeLa ERK3-NLuc were transfected with indicated constructs. 36h after transfection, the half-life of ERK3 was assessed by cycloheximide-chase experiment followed by luminescence measurement. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of relative ERK3 expression. Degradation curves were fitted to a one-phase decay model. Statistical significance was determined by two-way ANOVA with Bonferroni post-test using Graph Pad Prism Software version 5 (\*\*P < 0.01).

### 3.5.5 E6AP interacts with and promotes ERK3 ubiquitination.

We then investigated the mechanism for E6AP-dependent regulation of ERK3 turnover. We first sought to confirm the physical interaction of ERK3 and E6AP by

performing co-immunoprecipitation experiments. As expected, ectopically expressed ERK3 and E6AP were found to co-immunoprecipitate in 293T cells (Fig. 7A).

Finally, we aimed to determine the role of the ubiquitin ligase E6AP in regulation of ERK3 ubiquitination. GST-tagged ERK3 was co-expressed with either active or inactive form of E6AP and HA-tagged ubiquitin, and the ubiquitination state of ERK3 was analyzed by anti-HA immunoblotting after GST pull-down. Overexpression of enzymatically active E6AP induced a dramatic increase of ERK3 polyubiquitination (Fig. 7B). Interestingly, expression of a DN form of E6AP decrease the level of ERK3 ubiquitination in cells. Taken together, these results strongly suggest that E6AP regulates ERK3 expression and stability by regulating its ubiquitination level.



**Figure 7. E6AP interacts with and positively regulates ERK3 ubiquitination.**

(A) 293T cells were transfected with indicated constructs. 36h after transfected, cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibodies. Immunoprecipitated proteins were analyzed by immunoblotting with indicated antibodies. (B) 293T cells were transfected with pcDNA3-HA-ERK3-GST, pMT123-HA-Ubiquitin and p3868 HA-E6AP WT and C833A as indicated. After 48 h, the cells were lysed and ERK3 was pulled-down using glutathione-agarose beads. Ubiquitination was analyzed by immunoblotting with anti-HA antibody.

### 3.6 Discussion

Members of the classical MAP kinase family ERK1/2, JNK1/2 and p38 isoforms are stable proteins mainly regulated by protein interaction and phosphorylation (42, 43). Conversely, the atypical MAP kinase ERK3 is an unstable protein, ubiquitinated and degraded by the ubiquitin proteasome pathway (15, 16). We have recently proposed that control of ERK3 protein turnover is a main regulator of its biological activity (18). However, the complexes of E3 ligases and E2 conjugases that positively regulates ubiquitination and degradation of ERK3 remain to be identified. We developed a fusion protein luciferase system to assess ERK3 protein level in cells and used a loss-of-function RNAi screening approach to identify regulators of ERK3 turnover. In our system, the small size, bright Nanoluciferase is fused to the C-terminal extremity of full length ERK3. N-terminal extremity of ERK3 contains two domains, termed “N-degrons” essential to its ubiquitination (15). Moreover, contrary to most substrates for which ubiquitin are conjugated on internal lysines, ERK3 is ubiquitinated on the  $\alpha$ -amino group of its N-termini (16). In consequence, large N-terminal tags partially stabilize ectopic ERK3 protein by allosteric obstruction, thus decreasing the efficiency of the ubiquitin ligase machinery (16). In our system, the N-terminal region is left unaffected and the fusion protein is regulated in the same fashion as the endogenous ERK3. Our results validate the use of Nanoluciferase fusion protein system to identify regulators of turnover and abundance of a target protein in living cells.

ERK3 was recently identified as a putative substrate for CRL4 ubiquitin ligases complexes (30). Our results confirm that inhibition of these complexes induces a moderate but significant increase in ERK3 protein abundance. Moreover, we showed that inhibition of all CRL complexes with MLN4924 induced a stronger increase in ERK3 expression. Interestingly, we identified several subunits of CRL complexes in our screen. Most notably, we identified 4 members of the KCTD family that forms multimeric complexes that interact with Cullin 3 to form a functional ubiquitin ligase (44). We also identified several subunits of CRL7 complexes. However, inhibition of Cullin proteins did not induce an accumulation of ERK3 protein in our screen. In our RNAi screen experiment, most of the shRNA targeting Cullins

induced a decrease in cell viability measured by PrestoBlue. A similar effect was observed for inhibition of RBX1 a subunit of CRL complexes (45). Interestingly, RBX1 and most of the Cullins were identified as essential genes in several cell lines (46). Therefore, short term or inducible knockdown studies might be necessary to characterize the regulations of ERK3 by CRL complexes.

Analysis of the functions of putative ERK3 regulators highlighted a network of E3 ligases and E2 conjugases, centered on RNF8, an E3 ligase essential to DNA-damage response that can catalyze both K63-linked and K48-linked ubiquitin chains (47, 48). Interestingly, ERK3 has recently been shown to mediate DNA-damage response induced by Topoisomerase II targeting chemotherapy (8). Moreover, ERK3 stability is modulated in specific cellular contexts such as mitosis or terminal differentiation (15, 17). Therefore, further studies should determine if ERK3 ubiquitination and turnover are regulated in the context of DNA damage and whether the function of ERK3 in DNA-damage response is regulated by its protein turnover.

We have identified the E3 ligase E6AP as a regulator of ERK3 expression and stability by showing that E6AP physically interacts with ERK3 and increases its ubiquitination. Prior to this work, ERK3 and E6AP have been shown to coexist in a multimeric complex together with the E3 ligase HERC2 and the centrosomal protein NEURL4 (41). However, did not assess if E6AP was a regulator of ERK3 stability. We recently identified USP20 as a deubiquitinase for ERK3 and a positive regulator of its biological activity (18). Interestingly, USP20 was reported to interact with HERC2 and NEURL4 (49-52). Moreover, HERC2 mediates a negative regulation of USP20 stability that is inhibited in response to DNA damage (50, 51). Therefore, it is tempting to speculate that a complex formed of E6AP, HERC2, USP20 and the adaptor protein NEURL4 dynamically regulates ERK3 ubiquitination and stability.

ERK3 has been shown to positively regulate cell migration in breast cancer cell lines and invasiveness in lung cancer (5, 7). Moreover, our previous work has demonstrated that ERK3 protein turnover regulates its function. Induction of USP20 activity, a positive regulator of ERK3 protein expression, results in an increase in breast cancer cells migration (18). Interestingly, E6AP has recently been proposed as a negative regulator of breast cancer migration and metastasis (25). Therefore, further studies should assess the effects of E6AP on

ERK3-dependent cell migration and invasiveness and characterize the involvement of ERK3 in cancer progression.

### 3.7 References

1. Zhu AX, Zhao Y, Moller DE, Flier JS. Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(12):8202-11.
2. Meloche S, Beatty BG, Pellerin J. Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3. *Oncogene*. 1996;13(7):1575-9.
3. Seternes OM, Mikalsen T, Johansen B, Michaelsen E, Armstrong CG, Morrice NA, et al. Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *The EMBO journal*. 2004;23(24):4780-91.
4. Schumacher S, Laass K, Kant S, Shi Y, Visel A, Gruber AD, et al. Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *The EMBO journal*. 2004;23(24):4770-9.
5. Long W, Foulds CE, Qin J, Liu J, Ding C, Lonard DM, et al. ERK3 signals through SRC-3 coactivator to promote human lung cancer cell invasion. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(5):1869-80.
6. Wang W, Bian K, Vallabhaneni S, Zhang B, Wu RC, O'Malley BW, et al. ERK3 promotes endothelial cell functions by upregulating SRC-3/SP1-mediated VEGFR2 expression. *Journal of cellular physiology*. 2014;229(10):1529-37.
7. Al-Mahdi R, Babteen N, Thillai K, Holt M, Johansen B, Wetling HL, et al. A novel role for atypical MAPK kinase ERK3 in regulating breast cancer cell morphology and migration. *Cell adhesion & migration*. 2015;9(6):483-94.
8. Bian K, Muppani NR, Elkhadragy L, Wang W, Zhang C, Chen T, et al. ERK3 regulates TDP2-mediated DNA damage response and chemoresistance in lung cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(6):6665-75.
9. Klinger S, Turgeon B, Levesque K, Wood GA, Aagaard-Tillery KM, Meloche S. Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(39):16710-5.
10. Marquis M, Daudelin JF, Boulet S, Sirois J, Crain K, Mathien S, et al. The catalytic activity of the mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 3 is required to sustain CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocyte survival. *Molecular and cellular biology*. 2014;34(18):3374-87.
11. Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR. 2011;75(1):50-83.
12. Deleris P, Trost M, Topisirovic I, Tanguay PL, Borden KL, Thibault P, et al. Activation loop phosphorylation of ERK3/ERK4 by group I p21-activated kinases (PAKs) defines a novel PAK-ERK3/4-MAPK-activated protein kinase 5 signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(8):6470-8.



13. De la Mota-Peynado A, Chernoff J, Beeser A. Identification of the atypical MAPK Erk3 as a novel substrate for p21-activated kinase (Pak) activity. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(15):13603-11.
14. Deleris P, Rousseau J, Coulombe P, Rodier G, Tanguay PL, Meloche S. Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5. *Journal of cellular physiology*. 2008;217(3):778-88.
15. Coulombe P, Rodier G, Pelletier S, Pellerin J, Meloche S. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(13):4542-58.
16. Coulombe P, Rodier G, Bonneil E, Thibault P, Meloche S. N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(14):6140-50.
17. Tanguay PL, Rodier G, Meloche S. C-terminal domain phosphorylation of ERK3 controlled by Cdk1 and Cdc14 regulates its stability in mitosis. *The Biochemical journal*. 2010;428(1):103-11.
18. Mathien S, Dél  ris P, Soulez M, Voisin L, Meloche S. Deubiquitinating Enzyme USP20 Regulates Extracellular Signal-Regulated Kinase 3 Stability and Biological Activity. *Molecular and cellular biology*. 2017;37(9).
19. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(2):775-84.
20. Williams CA, Beaudet AL, Clayton-Smith J, Knoll JH, Kyllerman M, Laan LA, et al. Angelman syndrome 2005: updated consensus for diagnostic criteria. *American journal of medical genetics Part A*. 2006;140(5):413-8.
21. Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattana  ch BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, et al. Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, Ube3a, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nature genetics*. 1997;17(1):75-8.
22. Jiang YH, Armstrong D, Albrecht U, Atkins CM, Noebels JL, Eichele G, et al. Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron*. 1998;21(4):799-811.
23. Li L, Li Z, Howley PM, Sacks DB. E6AP and calmodulin reciprocally regulate estrogen receptor stability. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(4):1978-85.
24. Greer PL, Hanayama R, Bloodgood BL, Mardinly AR, Lipton DM, Flavell SW, et al. The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. *Cell*. 2010;140(5):704-16.
25. Mansour M, Haupt S, Chan AL, Godde N, Rizzitelli A, Loi S, et al. The E3-ligase E6AP Represses Breast Cancer Metastasis via Regulation of ECT2-Rho Signaling. *Cancer Res*. 2016;76(14):4236-48.
26. van Wijk SJ, de Vries SJ, Kemmeren P, Huang A, Boelens R, Bonvin AM, et al. A comprehensive framework of E2-RING E3 interactions of the human ubiquitin-proteasome system. *Molecular systems biology*. 2009;5:295.
27. Woodsmith J, Jenn RC, Sanderson CM. Systematic Analysis of Dimeric E3-RING Interactions Reveals Increased Combinatorial Complexity in Human Ubiquitination Networks. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*. 2012;11(7):M111.016162.

28. Markson G, Kiel C, Hyde R, Brown S, Charalabous P, Bremm A, et al. Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network. *Genome research*. 2009;19(10):1905-11.
29. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2005;21(16):3448-9.
30. Emanuele Michael J, Elia Andrew EH, Xu Q, Thoma Claudio R, Izhar L, Leng Y, et al. Global Identification of Modular Cullin-RING Ligase Substrates. *Cell*. 2011;147(2):459-74.
31. Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*. 2009;458(7239):732-6.
32. Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, Butler BL, Wood MG, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS chemical biology*. 2012;7(11):1848-57.
33. Lorick KL, Jensen JP, Weissman AM. Expression, Purification, and Properties of the Ubc4/5 Family of E2 Enzymes. *Methods in Enzymology*. Volume 398: Academic Press; 2005. p. 54-68.
34. Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual review of biochemistry*. 2009;78:399-434.
35. Wen H, Kim N, Fuentes EJ, Mallinger A, Gonzalez-Alegre P, Glenn KA. FBG1 is a promiscuous ubiquitin ligase that sequesters APC2 and causes S-phase arrest. *Cell cycle* (Georgetown, Tex). 2010;9(22):4506-17.
36. Ponyeam W, Hagen T. Characterization of the Cullin7 E3 ubiquitin ligase--heterodimerization of cullin substrate receptors as a novel mechanism to regulate cullin E3 ligase activity. *Cellular signalling*. 2012;24(1):290-5.
37. Marblestone JG, Butt S, McKelvey DM, Sterner DE, Mattern MR, Nicholson B, et al. Comprehensive Ubiquitin E2 Profiling of Ten Ubiquitin E3 Ligases. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2013;67(1):161-7.
38. Huang L, Kinnucan E, Wang G, Beaudenon S, Howley PM, Huibregtse JM, et al. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science* (New York, NY). 1999;286(5443):1321-6.
39. Liu Z, Xiang Y, Sun G. The KCTD family of proteins: structure, function, disease relevance. *Cell & Bioscience*. 2013;3(1):45.
40. Campbell SJ, Edwards RA, Leung CC, Neculai D, Hodge CD, Dhe-Paganon S, et al. Molecular insights into the function of RING finger (RNF)-containing proteins hRNF8 and hRNF168 in Ubc13/Mms2-dependent ubiquitylation. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(28):23900-10.
41. Martinez-Noel G, Galligan JT, Sowa ME, Arndt V, Overton TM, Harper JW, et al. Identification and proteomic analysis of distinct UBE3A/E6AP protein complexes. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(15):3095-106.
42. Morrison DK, Davis RJ. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:91-118.
43. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*. 2001;22(2):153-83.

44. Ji AX, Chu A, Nielsen TK, Benlekbir S, Rubinstein JL, Privé GG. Structural Insights into KCTD Protein Assembly and Cullin3 Recognition. *Journal of Molecular Biology*. 2016;428(1):92-107.
45. Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, et al. Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*. 2002;416(6882):703-9.
46. Wang T, Birsoy K, Hughes NW, Krupczak KM, Post Y, Wei JJ, et al. Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science (New York, NY)*. 2015;350(6264):1096-101.
47. Kolas NK, Chapman JR, Nakada S, Ylanko J, Chahwan R, Sweeney FD, et al. Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science (New York, NY)*. 2007;318(5856):1637-40.
48. Lok GT-M, Sy SMH, Dong S-S, Ching Y-P, Tsao SW, Thomson TM, et al. Differential regulation of RNF8-mediated Lys48- and Lys63-based poly-ubiquitylation. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(1):196-205.
49. Li J, D'Angiolella V, Seeley ES, Kim S, Kobayashi T, Fu W, et al. USP33 regulates centrosome biogenesis via de-ubiquitylation of a centriolar protein, CP110. *Nature*. 2013;495(7440):10.1038/nature11941.
50. Yuan J, Luo K, Deng M, Li Y, Yin P, Gao B, et al. HERC2-USP20 axis regulates DNA damage checkpoint through Claspin. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(21):13110-21.
51. Zhu M, Zhao H, Liao J, Xu X. HERC2/USP20 coordinates CHK1 activation by modulating CLASPIN stability. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(21):13074-81.
52. Galligan JT, Martinez-Noël G, Arndt V, Hayes S, Chittenden TW, Harper JW, et al. Proteomic Analysis and Identification of Cellular Interactors of the Giant Ubiquitin Ligase HERC2. *Journal of Proteome Research*. 2015;14(2):953-66.

## **CHAPITRE IV : Discussion**

L'objet principal de cette thèse est l'étude des mécanismes de régulation de la stabilité de ERK3. La première partie de cette discussion s'intéresse donc essentiellement aux connaissances apportées par cette thèse dans ce domaine et à leur signification. Néanmoins, la question des régulations de ERK3 ne peut être abordée isolément de la question de la compréhension de ses fonctions cellulaires. Il s'agit, à mon sens, d'une question primordiale qui reste en grande partie non répondue. La seconde partie de cette discussion, bien qu'approchée sous l'angle de ERK3 et de ses régulateurs, s'intéresse donc plus en profondeur aux fonctions cellulaires de la protéine. J'ai de plus, en marge de ce travail principal de thèse, consacré des efforts à tenter de comprendre un peu mieux les fonctions de la protéine. Ils seront donc eux aussi abordés dans cette deuxième partie.

### **4.1 La régulation de la stabilité de ERK3**

#### **4.1.1 Les acteurs de la régulation.**

La régulation de l'expression de ERK3 par le système ubiquitine-protéasome a été révélée par Philippe Coulombe, étudiant au doctorat dans le laboratoire du Dr. Meloche il y a un peu plus de dix ans (134). Ses travaux ont permis de démontrer que ERK3 est une protéine très instable, constitutivement dégradée dans des cellules en prolifération, mais aussi que cette régulation est dynamique, c'est-à-dire qu'elle peut être modulée dans certains contextes physiologiques. Initialement décrite dans le cadre de la différenciation de précurseurs neuronaux et musculaires *in vitro*, cette modulation de la stabilité de ERK3 a ensuite été démontrée dans le contexte du cycle cellulaire. Pierre-Luc Tanguay, un autre étudiant au doctorat du laboratoire, a montré que la protéine ERK3 est stabilisée dans des cellules HeLa en mitose (138). Ces études menées au sein du laboratoire sur la régulation de l'ubiquitination et de la stabilité de ERK3 ont permis d'en identifier certains des déterminants moléculaires. Il a ainsi été établi que ERK3 est sujette à un mode d'ubiquitination non conventionnel qui

catalyse la conjugaison de molécules d'ubiquitine sur son extrémité N-terminale (353). Il a aussi été montré que la phosphorylation de l'extension C-terminale de ERK3 en mitose induisait sa stabilisation (138). Néanmoins, l'identité des régulateurs de l'ubiquitination et de la stabilité était restée inconnue jusqu'à ce jour.

#### **4.1.1.1 Existe-t-il plusieurs DUB pour ERK3 ?**

Dans le chapitre 2 de cette thèse, nous décrivons l'identification et la caractérisation de la protéine USP20 comme DUB de ERK3, qui régule positivement sa stabilité et son expression protéique. Nous avons pu démontrer que ERK3 est un substrat direct de USP20. Finalement, nous avons montré que USP20 est un régulateur de l'activité biologique de ERK3, notamment dans le contexte de la migration cellulaire.

Cependant, les données expérimentales présentées dans cette étude suggèrent fortement que USP20 n'est pas la seule DUB à réguler la stabilité de ERK3. Nous avons en effet identifié plusieurs DUB dans notre crible dont la perte d'expression induit une diminution des niveaux protéiques de ERK3. De plus, l'inhibition de l'expression de USP20 a un effet modéré sur l'abondance et la stabilité de ERK3, comparativement à sa surexpression. Il semblerait donc qu'il y ait une redondance fonctionnelle entre plusieurs DUB pour réguler positivement la stabilité de ERK3. Ce cas de figure ne serait pas unique, puisqu'il existe de nombreuses protéines qui sont régulées par plus d'une DUB. Ainsi la CLASPIN, un autre substrat de USP20, est aussi déubiquitinée par USP7, USP28 et USP29 (533-537).

Le candidat le plus évident comme co-régulateur de ERK3 serait sans doute USP33, le membre de la famille des USP qui partage le plus d'homologies avec USP20 (538). De plus, dans notre crible fonctionnel, le siRNA dirigé contre USP33 induit une baisse de l'expression protéique de ERK3. Les enzymes USP20 et USP33 partagent une forte homologie et certaines régulations, notamment par les E3 ligases VHL et HERC2 (535, 538, 539), mais peu de redondance fonctionnelle. Ainsi, il a été démontré que HIF1 $\alpha$  est un substrat de USP20 mais

pas de USP33 (437). À l'inverse, USP33 régule fortement la stabilité et l'expression de la protéine centrosomale CP110, alors que USP20 n'a qu'un effet très limité sur ces fonctions (540). Nous avons testé la capacité de USP33 à réguler l'expression protéique de ERK3. Nous avons employé une stratégie de surexpression similaire à celle utilisée pour USP20. Nos résultats montrent que la surexpression de USP33 ne modifie pas les niveaux d'expression de ERK3 (résultats non montrés). De manière similaire avec ce qui est décrit pour d'autres substrats de ces enzymes dans la littérature, USP33 ne semble donc contribuer que marginalement au contrôle de la stabilité de ERK3.

Une autre DUB potentielle de ERK3 pourrait être trouvée parmi les autres régulateurs identifiés dans notre crible. Il convient d'ailleurs de noter que dans cette expérience USP20 ne semble pas être le régulateur dont l'inhibition a le plus grand effet sur l'expression de ERK3. Ce point constitue sans doute une limite dans la stratégie que nous avons adoptée pour choisir notre candidat d'intérêt. En effet, nos travaux se sont concentrés sur USP20 car cette dernière avait préalablement été identifiée comme un interacteur potentiel de ERK3. Une stratégie alternative aurait pu être de s'intéresser aux déubiquitinasés dont la perte d'expression induit la diminution des niveaux de ERK3 la plus grande. Au chapitre 2, nous avons testé la double inhibition des deux meilleurs candidats du crible, USP16 et USP13. Ces résultats suggèrent que USP13 et USP20 ont une redondance fonctionnelle dans le contrôle de l'expression de ERK3.

La protéine USP13 est une DUB qui a été initialement décrite pour catalyser préférentiellement l'hydrolyse des chaînes de polyubiquitine de type K-63 (541). Néanmoins, elle a ensuite été décrite pour déubiquitiner et stabiliser plusieurs substrats dont USP10, le facteur de transcription « microphthalmia-associated transcription factor » (MITF) et le suppresseur de tumeur PTEN (542-544). Bien que les données préliminaires dont nous disposons ne permettent pas de dire si USP13 est une autre DUB de ERK3 ou si l'effet observé est indirect, il est possible que ERK3 soit un substrat de USP13. Il s'agit donc d'un candidat régulateur de ERK3 qui mériterait d'être caractérisé.

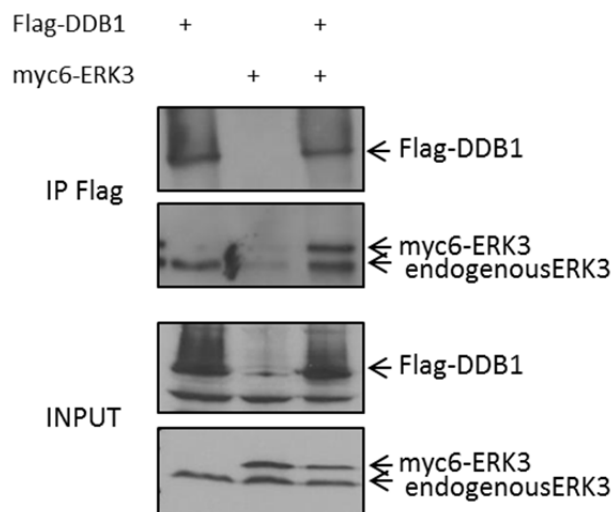
#### 4.1.1.2 Existe-t-il plusieurs E3 ligases pour ERK3 ?

Le chapitre 3 de la thèse décrit un crible fonctionnel RNAi qui nous a mené à identifier l'ubiquitine ligase E6AP comme un régulateur de l'ubiquitination et la dégradation de ERK3. Si nos résultats suggèrent fortement que E6AP est une E3 ligase de ERK3, puisque les deux protéines interagissent et que la modulation de la fonction de E6AP se traduit par une modulation des niveaux d'ubiquitination de ERK3, nous ne pouvons pas exclure que cette régulation soit indirecte. Des études *in vitro* devront donc être menées pour déterminer si ERK3 est un substrat direct de E6AP.

De la même façon que pour les DUB, certaines de nos données suggèrent qu'il n'existe pas une ubiquitine ligase unique de ERK3, mais un réseau d'enzymes aux fonctions redondantes qui coopèrent pour déstabiliser la protéine. Plusieurs de nos observations soutiennent l'hypothèse de ces régulateurs multiples. Premièrement, l'inhibition de l'activité d'une seule ligase (expression de E6AP DN) ou d'une sous-famille de ligases (inhibition chimique des complexes CRL) induit une accumulation de ERK3 relativement faible comparativement à ce qui est observé pour l'inhibition du protéasome. Deuxièmement, l'inhibition de l'expression des E2 conjuguées identifiées dans nos cribles de régulateurs induit une accumulation de ERK3 plus élevée, comparativement à ce qui est observé pour les E3 ligases. Étant donné que plusieurs enzymes E3 peuvent collaborer avec une seule enzyme E2, ce résultat suggère encore une fois une redondance entre des E3 ligases pour la déstabilisation de ERK3.

Il doit donc exister d'autres régulateurs qui collaborent avec E6AP pour réguler ERK3. Parmi ces candidats se trouvent certains des complexes de type CRL, puisque nous rapportons que leur inhibition induit une augmentation de l'expression de ERK3. Cette observation a aussi été rapportée dans la littérature pour les complexes CRL4, pour lesquelles l'expression d'un DN induit une accumulation de ERK3 (281). De plus des expériences d'identification des interacteurs de ERK3 à grande échelle par purification par affinité couplée à de la spectrométrie de masse, menées dans le laboratoire, ont permis d'identifier DDB1, une sous-unité des complexes CRL4, comme une protéine liant ERK3. Nous avons confirmé cette interaction par des expériences de co-immunoprécipitation (figure 2). Les expériences

d'interactomique ont aussi permis d'identifier trois protéines de type DCAF (DDB1 and CUL4-associated factors), GRWD1, RBBP4 et RBBP7, qui sont des sous-unités des complexes CRL4 qui servent de récepteurs aux substrats (545).



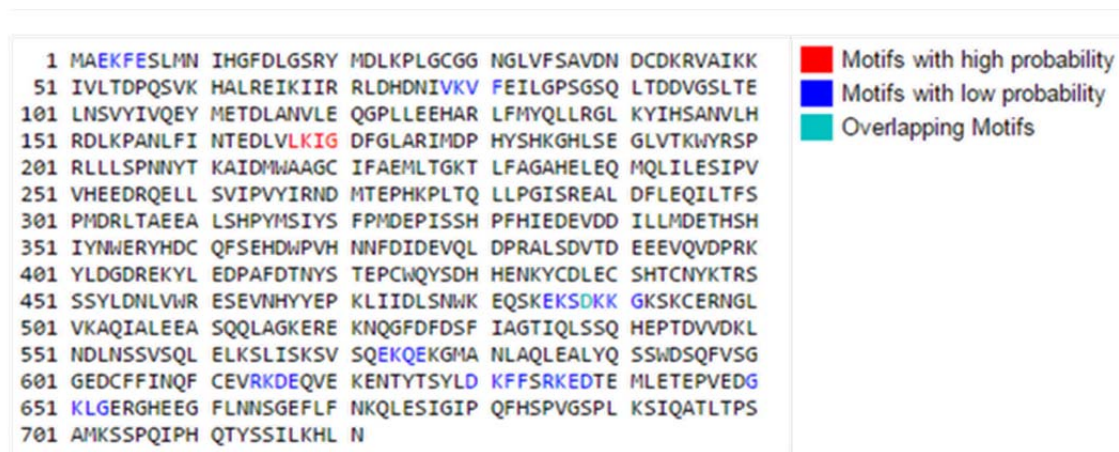
**Figure 1. Erk3 interagit avec DDB1.**

Des cellules 293T ont été transfectées avec les constructions indiquées. 36h après transfections, les complexes protéiques ont été immunoprécipités avec des anticorps dirigés contre le marqueur Flag. L'interaction entre ERK3 et DDB1 a été évaluée par immunobuvardage.

Notre crible fonctionnel ciblant les E3 ligases a aussi mené à l'identification des sous-unités des complexes CRL3 et CRL7. En revanche, cette expérience n'a pas permis d'identifier les cullines ou la protéine RBX1, qui est présente dans tous les complexes CRL, comme régulateurs potentiels de ERK3. Néanmoins, une inspection détaillée des résultats, notamment des données de normalisation par la viabilité cellulaire, nous indique que l'inhibition de l'expression de ces protéines semble être inhibiteur de la prolifération et/ou inducteur de la mortalité cellulaire. Il existe donc plusieurs données qui pointent vers un rôle des complexes CRL dans le contrôle de la stabilité de ERK3. Cette régulation, particulièrement celle des complexes CRL4, pourrait donc faire l'objet d'une étude plus détaillée.



Notre crible nous a permis de découvrir d'autres régulateurs potentiels de ERK3. Ainsi, parmi les E2 conjuguases, le candidat qui induit le plus d'accumulation de ERK3 est UBE2I, mieux connu sous le nom de Ubc9, qui est la seule SUMO conjugase encodée par le génome humain (546). Il existe des phénomènes de couplage bien connus entre les processus de SUMOylation et d'ubiquitination pour gouverner la dégradation des protéines. Le plus connu d'entre eux est l'existence d'ubiquitines ligases dépendantes de SUMO (voir revue (547)). Il s'agit d'enzymes qui reconnaissent des substrats protéiques ayant été préalablement SUMOylés. L'ubiquitine ligase dépendante de SUMO la mieux caractérisée est sans doute RNF4 (548). De manière intéressante il s'agit aussi d'un des candidats régulateurs de ERK3 identifié dans notre crible. De plus, l'analyse des interactions E3/E2 nous indique que nous avons potentiellement identifié plusieurs complexes RNF4-E2 conjuguases régulateurs de ERK3 (Chapitre 3 et (408)). Néanmoins, il n'existe pas de motif consensus  $\Psi$ -K-x-D/E de SUMOylation dans la séquence de ERK3. En revanche, il a déjà été montré que certaines protéines peuvent être SUMOylées sur des sites « non-consensus » (549). L'utilisation du logiciel de prédiction en ligne SUMOplot indique plusieurs sites de SUMOylation potentiels pour ERK3, dont la lysine 168 où la probabilité de SUMOylation est définie comme haute par le programme (figure 3).



**Figure 2. Prédiction des sites de SUMOylation sur la protéine ERK3.**

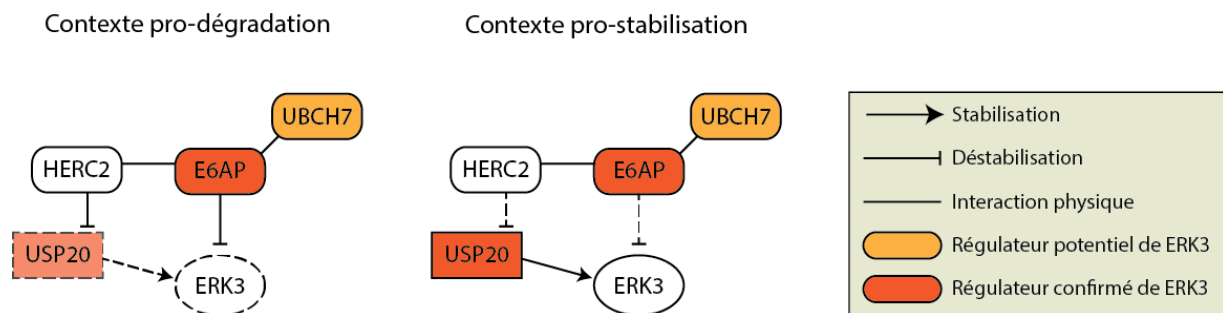
Copie d'écran réalisée avec le programme en ligne SUMOplot.

Il serait donc intéressant de déterminer si ERK3 est SUMOylée et si cette modification altère son ubiquitination et sa dégradation, notamment *via* l'activité de la ligase RNF4. La

caractérisation de substrats de la SUMOylation peut s'avérer difficile, spécifiquement dans le cas d'une protéine ubiquitinée comme ERK3, à cause de l'existence de chaînes mixtes ubiquitine/SUMO. Il existe néanmoins des techniques, basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse et de tests de lien entre protéines (proximity ligation assay), qui permettent de détecter la SUMOylation d'une protéine *in vitro* et *in vivo* (550-552). Cette étape permettrait ensuite de déterminer si la ligase RNF4 régule une forme SUMOylée de ERK3.

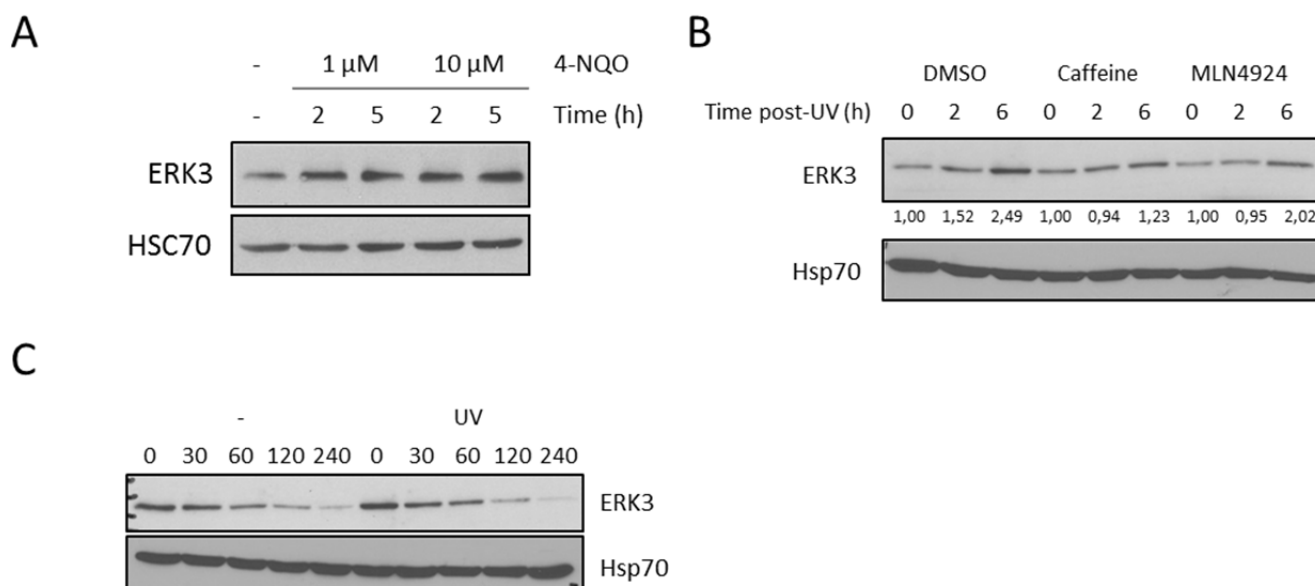
#### 4.1.1.3 Un réseau de régulateur centré autour de E6AP et USP20 ?

Les deux régulateurs de ERK3 que nous avons caractérisés sont USP20 et E6AP. Les protéines ERK3 et E6AP appartiennent à un complexe multiprotéique contenant notamment l'ubiquitine ligase HERC2 (553). Curieusement, HERC2 est une ubiquitine ligase qui interagit avec USP20 et induit sa dégradation dans des cellules non stimulées. En réponse à un stress réplicatif ou à un dommage à l'ADN de type UV, USP20 est phosphorylée par ATR, ce qui inhibe son interaction avec HERC2 et induit sa stabilisation (535, 536). Il semble donc exister un complexe fonctionnel où coexistent plusieurs régulateurs de ERK3 (figure 4). Ainsi dans certains contextes cellulaires, la dégradation de ERK3 pourrait être stimulée par son ubiquitination par E6AP et par la dégradation de USP20, elle-même stimulée par HERC2. À l'inverse, des stimuli induisant la stabilisation de ERK3 pourraient agir en inhibant conjointement E6AP et HERC2.



**Figure 3. Réseau de régulateurs de ERK3 centré autour de E6AP et USP20.**

Étant donné la régulation de USP20 par HERC2 décrite en réponse aux dommages à l'ADN, il paraît donc intéressant de se demander si ERK3 est régulée dans ce contexte. Des résultats préliminaires que nous avons obtenus suggèrent que les niveaux d'expression de ERK3 sont augmentés à court terme lorsque les cellules sont soumises à un dommage à l'ADN de type UV (figure 5A et B). La stabilisation et donc l'augmentation d'activité de USP20 en réponses aux dommages à l'ADN nécessitent sa phosphorylation par la kinase ATR (535, 536). De manière intéressante, un traitement à la caféine, un inhibiteur non spécifique des kinases ATM et ATR (554), inhibe presque complètement l'accumulation de ERK3 induite par les UV (figure 5B). Néanmoins, dans nos expériences l'augmentation de l'abondance protéique de ERK3 ne se traduit pas par une augmentation mesurable de la stabilité de la protéine (Figure 5C). La question de la régulation de la stabilité de ERK3 en réponse aux dommages à l'ADN de type UV reste donc à clarifier. L'étude des régulations de ERK3 par les membres du réseau E6AP/HERC2/USP20 dans ce contexte permettrait sans doute de répondre à cette question.



**Figure 4. Augmentation de l'expression protéique de ERK3 en réponse aux dommages à l'ADN de type UV.**

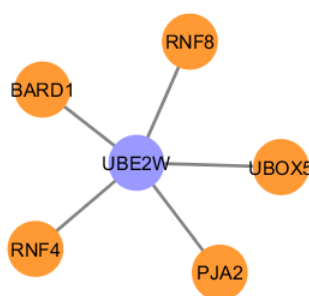
(A) Des cellules 293T ont été traitées avec le 4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO), un agent chimique induisant des dommages à l'ADN de type UV. Après les temps indiqués, l'expression de ERK3 a été analysée par immunobuvardage. (B, C) Des cellules 293T ont été traitées avec des rayons UV à des doses de 60J/m<sup>2</sup>. 6h après traitement, l'expression de ERK3 a été analysée par immunobuvardage (B) ou la stabilité de ERK3 a été évaluée par des expériences de cycloheximide chase (C).

#### 4.1.1.4 Les outils pour mieux comprendre l'ubiquitination N-terminale ?

Une des particularités les plus intéressantes de la régulation de ERK3 est son ubiquitination atypique sur son extrémité N-terminale (353). Ce mode d'ubiquitination alternatif, découvert il y a un peu plus d'une dizaine d'années, et décrit seulement pour une dizaine de substrats, est particulièrement intrigant (voir revue (555)). La conjugase UBE2W, en collaboration avec les E3 ligases RNF4 et BRCA1/BARD1 (breast cancer gene 1/BRCA1 Associated RING Domain 1), est la seule enzyme connue pour catalyser l'ubiquitination N-terminale (349, 350). Il a été établi que la présence de régions non structurées dans la partie N-

terminale des protéines est un des critères pour l'ubiquitination par UBE2W (351). L'utilisation de logiciel de prédiction de régions non structurées comme DisEMBL suggèrent que l'extrémité N-terminale de la protéine ERK3 répond à ces critères (556). D'autres enzymes connues pour réguler négativement l'ubiquitination N-terminale sont les DUB de la famille UCH (Ubiquitin C-terminal hydrolases), UCH-L1, UCH-L3 et UCH-L5, qui ont récemment été décrites comme possédant une activité DUB sur les chaînes de polyubiquitine conjuguées en N-terminal (427).

Au vu de ces informations, il est extrêmement intéressant de noter que nos cribles fonctionnels ont permis l'identification de la DUB UCH-L5, des ubiquitines ligases RNF4 et BARD1, et surtout de la conjugase UBE2W comme régulateurs potentiels de ERK3. De plus nous avons identifié plusieurs E3 ligases qui, si elles ne sont pas connues pour être impliquées dans l'ubiquitination N-terminale, sont des interacteurs de UBE2W (figure 6).



**Figure 5. Les partenaires de UBE2W identifiés comme régulateurs potentiels de ERK3.**

L'identification de ces régulateurs de ERK3, permettrait, s'ils sont confirmés, d'étudier ce mode particulier d'ubiquitination. En effet, plusieurs questions essentielles sur l'ubiquitination N-terminale restent à ce jour sans réponse. Il n'existe par exemple pratiquement aucune donnée sur ce processus *in vivo*. Les études du fonctionnement moléculaire de UBE2W dans l'ubiquitination N-terminale ont toutes été réalisées *in vitro* (349-351). Ces études rapportent, grâce à la spectrométrie de masse, l'existence de fragments peptidiques constitués de la fusion entre l'ubiquitine et l'extrémité N-terminale de substrats. Cette preuve directe a aussi été rapportée pour la protéine virale E7, qui ne possède

naturellement pas de lysines (352). Toutefois, il n'existe qu'une seule preuve directe de l'ubiquitination N-terminale en cellules, qui a été rapportée par Philippe Coulombe. Il s'agit de l'identification par spectrométrie de masse d'un peptide formé de l'ubiquitine liée à l'extrémité N-terminale d'une protéine HA-ERK3 surexprimée (353). Cependant, cette évidence d'ubiquitination N-terminale est sujette à discussion. En effet, l'épitope HA adopte une conformation non-structurée qui en fait un signal de reconnaissance pour UBE2W (351). Des molécules d'ubiquitine arborant un signal HA en N-terminal peuvent ainsi être assemblée en chaînes linéaires par UBE2W, ce qui n'est pas le cas de l'ubiquitine non-étiquetée. Il est donc raisonnable de penser que le signal HA interfère avec l'ubiquitination N-terminale de ERK3. La preuve directe de l'ubiquitination N-terminale d'un substrat protéique endogène reste donc toujours à fournir.

A ce manque de preuves directes de l'ubiquitination N-terminale s'ajoute la question de l'existence de cette modification dans des conditions physiologiques. En effet, en l'absence de technique de détection directe, la preuve expérimentale est faite en utilisant des mutants « lysineless » des substrats protéiques. Dans le cas où ces mutants se comportent comme les protéines sauvages en terme d'ubiquitination et de dégradation, on considère alors qu'elles sont ubiquitinées sur leur extrémité N-terminale. On peut toutefois questionner la pertinence de ces observations dans un contexte physiologique. La question qui se pose est la même que pour les autres modes d'ubiquitination alternatifs sur des sérines ou des thréonines de substrats qui ne possèdent pas de lysines (voir revue (557)).

L'ubiquitination N-terminale apparait-elle de manière « forcée » lorsqu'aucune lysine n'est disponible pour la machinerie d'ubiquitination (ou lorsque la réaction est facilitée *in vitro*), ou existe-t'elle de manière physiologique au même titre que l'ubiquitination de lysine internes ? Il existe deux manières de répondre à cette interrogation. La première est de fournir une preuve directe d'ubiquitination N-terminale d'un substrat endogène *in vivo*. La seconde est d'identifier un substrat de l'ubiquitination N-terminale, ainsi que ses régulateurs. Il devient alors possible, par des expériences de gain et perte de fonctions de caractériser l'ubiquitination N-terminale d'une protéine, et surtout d'en évaluer l'importance relative dans le contrôle général de l'ubiquitination et de la dégradation de cette protéine d'intérêt. Nos travaux ont permis d'identifier presque tous les acteurs connus de l'ubiquitination N-terminale comme des

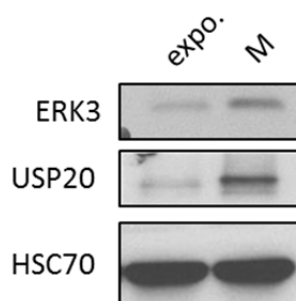
régulateurs potentiels de ERK3. L'ensemble composé par ERK3 et ses régulateurs constitue donc un outil unique pour comprendre l'ubiquitination N-terminale *in vivo*.

## **4.1.2 Les contextes cellulaires de la régulation de ERK3.**

### **4.1.2.1 Le cycle cellulaire**

Les étapes d'identification des régulateurs de ERK3 par criblage RNAi ont été réalisées dans des cellules en croissance exponentielle, car il s'agit d'un contexte où ERK3 est dégradée de manière constitutive (134). Toutefois, cette régulation est dynamique et peut être modulée dans certains contextes. Ainsi, dans le chapitre 2 nous montrons que USP20 stabilise ERK3 au cours de la différenciation myogénique de myoblastes murins C2C12, un contexte où la régulation de la stabilité de ERK3 est bien décrite (134).

Le cycle cellulaire est une autre situation physiologique où la stabilité de ERK3 est connue pour être régulée. Ainsi, on sait que ERK3 est stabilisée en mitose et dégradée en interphase (138). Dans cette étude, Pierre-Luc Tanguay a émis l'hypothèse que la phosphorylation de l'extension C-terminale de ERK3 inhiberait la liaison à une ubiquitine ligase ou induirait le recrutement d'une DUB. Il a été montré que USP20 est un régulateur de la kinase Plk1, un régulateur important de la mitose (436). USP20 est donc un candidat pour la régulation de ERK3 en mitose. Nous avons pu montrer que USP20, de manière similaire à ERK3, s'accumule en mitose dans des cellules HeLa (figure 6). De plus, la protéine présente un retard de migration sur gel, suggérant des événements de phosphorylation. En effet, il a été démontré que la protéine USP20 présente un retard sur gel dans des conditions de stress physiologique, causé par des phosphorylations corrélant avec une augmentation de son activité (558). Finalement, USP20 et ERK3 ont montré pouvoir être localisées au niveau du centrosome en mitose ((540) ; Pierre-Luc Tanguay et Sylvain Meloche, données non publiées). Il pourrait donc être intéressant de déterminer si l'augmentation d'expression de USP20 et/ou sa phosphorylation est responsable de la stabilisation de ERK3 en mitose.



**Figure 6. L'expression protéique de USP20 est augmentée en mitose.**

Des cellules HeLa ont été synchronisées en mitose par double blocage à la thymidine/nocodazole. (Décrit en réf. 22). L'expression de ERK3 et USP20 a été analysée. Expo : cellules en croissance exponentielle ; M : Mitose.

En revanche la protéine E6AP semble elle aussi atteindre un maximum d'expression en mitose dans des cellules HEK293 (559). Il doit donc exister un système qui fait en sorte que ERK3 n'est pas régulée négativement par E6AP en mitose pour qu'il soit possible d'en mesurer l'accumulation. Une localisation cellulaire différente semble à exclure, puisque les protéines peuvent toutes deux se retrouver au centrosome en mitose ((559) ; Pierre-Luc Tanguay et Sylvain Meloche, données non publiées). En revanche, la phosphorylation de ERK3 par CDK1 en mitose pourrait modifier sa configuration et inhiber l'interaction avec E6AP. Cette hypothèse reste néanmoins à tester.

#### 4.1.2.2 L'hypoxie comme régulateur de la stabilité de ERK3 ?

Les réponses cellulaires à l'hypoxie font largement intervenir le système ubiquitine-protéasome. L'adaptation hypoxique la plus caractérisée est sans doute la stabilisation du facteur de transcription HIF1 $\alpha$  (voir revue (560)). En conditions normoxiques HIF1 $\alpha$  est hydroxylé par des prolyl hydroxylases et des asparaginyl hydroxylases, induisant le recrutement de l'ubiquitine ligase VHL, qui catalyse l'ubiquitination de HIF1 $\alpha$  et conduit à sa dégradation. En conditions hypoxiques, la réaction d'hydroxylation ne peut se faire faute d'oxygène et HIF1 $\alpha$  n'est plus dégradé, induisant l'expression d'un ensemble de gènes médiateurs des réponses à l'hypoxie. À ce modèle simplifié s'ajoutent de nombreux autres régulateurs de la stabilité de HIF1 $\alpha$ , au nombre desquels USP20, qui incidemment est aussi un



substrat de VHL (437, 538). Ainsi, l'expression de USP20 participe à la stabilisation de HIF1 $\alpha$  en conditions d'hypoxie. Toutefois il n'est pas déterminé si l'expression et/ou l'activité de USP20 sont régulées dans ces conditions.

De manière intéressante, nous avons montré dans le chapitre 2 que le traitement de cellules avec le chlorure de cobalt, un agent mimétique de l'hypoxie induit une stabilisation de ERK3 qui est dépendante de USP20. L'hypoxie peut aussi moduler l'activité biologique de E6AP. Dans des conditions de carence en oxygène, E6AP n'interagit plus avec son substrat p53 (561). De plus, nous avons identifié l'ubiquitine ligase VHL comme un régulateur potentiel de ERK3 dans nos expériences de criblage, réalisées en conditions normoxiques. Il serait donc envisageable que la régulation de ERK3 soit modulée par la teneur en oxygène du milieu. En accord avec cette idée, une étude récente publiée par le groupe de Alex von Kriegsheim, indique que ERK3 est hydroxylée sur sa proline 25 par la prolyl hydroxylase PHD3 (529). En revanche, contrairement à ce que suggèrent nos données, les auteurs de cette étude émettent l'hypothèse que l'hydroxylation de ERK3 stabilise la protéine. À l'inverse de ce que nous observons avec un agent mimétique de l'hypoxie, l'inhibition chimique de PHD3, avec deux inhibiteurs chimiques, le JNJ-42041935 et le dimethyloxaloylglycine (DMOG) (562, 563), induit une diminution de l'expression protéique de ERK3. À l'aide d'un crible d'interaction, les auteurs émettent l'hypothèse que l'hydroxylation de ERK3 sur sa proline 25 induit une inhibition de la liaison des ubiquitines ligases E6AP et HUWE1, ce qui selon eux expliquerait la stabilisation de ERK3. L'interprétation de ces résultats semble toutefois sujette à caution. Ainsi dans cette étude les auteurs étudient majoritairement l'expression et la stabilité d'une protéine ERK3 surexprimée portant un tag Flag en N-terminal. De plus la plupart des expériences sont réalisées dans un contexte où PHD3 est surexprimée. L'effet des inhibiteurs de PHD3 et de la surexpression de cette dernière semblent de plus inconsistent entre tous les résultats proposés. D'autre part, certains de nos résultats ne concordent pas avec l'hypothèse d'interaction proposée par les auteurs. Nous avons en effet investigué l'interaction entre ERK3 et HUWE1 par des essais de co-immunoprécipitation, dans le même modèle cellulaire que celui utilisé pour l'étude de PHD3, sans réussir à mettre en évidence de liaison entre les protéines. De plus, les shRNA dirigés contre HUWE1 dans notre crible n'induisent pas de modification de l'expression protéique de ERK3. Il convient bien évidemment de noter

que nos résultats n'excluent en rien la possibilité d'une régulation de ERK3 par HUWE1. Néanmoins, cette dernière mériterait sans doute d'être plus amplement caractérisée.

Les approches expérimentales utilisées pour nos observations et celles du groupe de Alex von Kriegsheim semblent donc en contradiction. Cependant aucune n'a permis d'étudier directement l'effet de l'hypoxie sur l'expression de ERK3. Il serait donc intéressant d'étudier l'ubiquitination et la dégradation de ERK3 à l'aide d'une chambre hypoxique et de déterminer l'importance relative de USP20, E6AP et VHL dans ces régulations.

#### **4.1.3 Conclusion - La régulation de la stabilité de ERK3 : un système multifactoriel complexe.**

Les travaux réalisés au cours de mon doctorat ont permis d'identifier et de caractériser deux régulateurs de la stabilité de ERK3, la DUB USP20 et l'ubiquitine ligase E6AP. Néanmoins, les résultats que nous avons obtenus démontrent clairement que ces régulateurs ne sont pas les seuls. Il semble y avoir une redondance fonctionnelle, aussi bien parmi les DUB que parmi les ubiquitines ligases. Nos travaux ont permis d'établir certaines hypothèses, détaillées dans les chapitres précédents de la discussion, quant à l'identité de ces facteurs qui collaborent avec USP20 et E6AP.

Le cas de figure de ERK3 ne semble pas unique. Certains des substrats du système ubiquitine-protéasome, en particulier ceux qui ont une demi-vie courte comme ERK3, semblent aussi être régulés par des systèmes redondants. C'est le cas par exemple de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 qui est ubiquitiné par les complexes CRL4 et SCF (CRL1) (564). Le suppresseur de tumeur p53 a de son côté été identifié comme un substrat de plus d'une dizaine d'ubiquitines ligases parmi lesquelles Mdm2 (565), E6AP (566), Pirh2 (567) ou COP1 (568).

Si cette redondance complique l'identification des régulateurs de la stabilité de ERK3, elle nous apporte une information pertinente. La cellule déploie une importante quantité d'énergie pour garder la protéine ERK3 instable et pour en réguler minutieusement les niveaux d'abondance protéique. Un exemple frappant de l'ampleur de cette pression de dégradation est illustré dans notre étude des relations ERK3/USP20. Dans ces travaux nous

avons utilisé une forme de ERK3 arborant un épitope Myc<sub>6</sub> N-terminal, qui est décrite pour être plus stable que la forme endogène de la protéine. En effet la présence d'un épitope volumineux, Myc<sub>6</sub> ou GFP par exemple, inhibe l'ubiquitination N-terminale de ERK3 (353). De manière surprenante, la surexpression de USP20 induit une accumulation de cette version déjà stabilisée de ERK3. Ces résultats, en plus de supporter l'idée qu'il existe plusieurs mécanismes d'ubiquitination qui coopèrent pour la réguler, indiquent l'ampleur de la pression de dégradation ciblant ERK3. Finalement, l'hypothèse de l'existence d'un réseau de régulateurs composé de E6AP et HERC2-USP20 qui converge vers la dégradation de ERK3 semble être un élément supplémentaire qui indique qu'il existe une coordination de divers éléments pour réguler ERK3.

Pourquoi la cellule dépense t'elle autant d'énergie pour promouvoir la dégradation de ERK3 ? Certaines données de la littérature laissent penser que l'accumulation de ERK3 pourrait être particulièrement délétère. En effet, la surexpression de forme stables de ERK3 induit une inhibition de l'entrée en phase S dans des fibroblastes en culture (134, 135). Cette situation est comparable aux inhibiteurs du cycle cellulaire que sont p21 et p53. Dans des cellules normales, la pression de dégradation sur ces deux protéines est forte (comme le montre la redondance des machineries d'ubiquitination les ciblant), pour permettre aux cellules de proliférer. On peut donc émettre l'hypothèse que la redondance des signaux de dégradation ciblant ERK3 est due à son rôle d'inhibition du cycle cellulaire dans des cellules normales.

La problématique n'est toutefois pas la même dans un contexte de cellules cancéreuses. Dans ces conditions, il a été montré que la surexpression de ERK3 induit une augmentation de la migration de cellules issues de cancers mammaires et pulmonaires, ce qui s'accompagne d'une augmentation du potentiel invasif dans les carcinomes pulmonaires (112, 149). Finalement, il a été démontré que l'expression de la protéine ERK3 est augmentée dans ces cancers, comparativement aux tissus sains (112). Ces études suggèrent que ERK3 semble avoir un rôle pro-oncogénique. Dans ces conditions la pression de dégradation dirigée contre ERK3 agirait alors comme un facteur suppresseur de tumeur. Il existe plusieurs démonstrations publiées d'oncogènes ou de protéines pro-oncogéniques dont l'expression est contrôlée par le système ubiquitine-protéasome. C'est le cas par exemple de c-Myc, de c-Jun

ou de la cycline E, dont la dégradation est médiée par le complexe ubiquitine ligase SCF<sup>Fbw7</sup>, dont l'activité est perdue dans de nombreux types de cancers (voir revue (569)).

L'accumulation de ERK3 peut donc avoir des effets différents dépendamment des contextes, néanmoins il semble qu'en dehors de certaines conditions particulières les effets en soient délétères, ce qui expliquerait la redondance des mécanismes de dégradation. Cependant, nos travaux indiquent aussi une redondance pour la stabilisation de ERK3 par les DUB. Si le maintien de l'instabilité de ERK3 est si important pour la cellule, pourquoi existe-t-il parallèlement plusieurs composantes de stabilisation de la protéine ? Dans ce cas-ci, la littérature est plus avare de réponses. Comme discuté précédemment, il a été démontré que ERK3 s'accumule au cours de la différenciation de précurseurs neuronaux et myogéniques et lors de la mitose de cellules HeLa en culture. Nos résultats nous indiquent aussi que l'expression de ERK3 est augmentée lorsque que le pH de cellules en culture est acide, où lorsque les cellules sont traitées avec un mimétique de l'hypoxie. Néanmoins les conséquences fonctionnelles de cette accumulation, et donc leur importance physiologique, restent à déterminer. En revanche, l'activation des lymphocytes T est un contexte où l'expression protéique de ERK3 est stimulée et dans lequel la fonction de la protéine n'est pas inconnue. Dans une étude, à laquelle j'ai collaboré au cours de mon doctorat, nous avons montré que l'activation des lymphocytes T induite par la stimulation du récepteur aux cellules T (TCR pour T cell receptor) induit une augmentation de l'expression de l'ARN messager et de l'abondance protéique de ERK3 (570). Dans ce modèle ERK3 est nécessaire à la prolifération et à la sécrétion de cytokines activatrices et il apparaît donc nécessaire de maintenir des niveaux élevés de la protéine. Néanmoins, l'effet de la perte de fonction des régulateurs positifs de la stabilité de ERK3 dans ce contexte est à ce jour inconnue. Des études fonctionnelles sont donc encore nécessaires pour comprendre les conséquences de l'accumulation de ERK3 dans ces contextes particuliers.

Finalement, il existe un autre niveau de complexité dans l'étude de la régulation de ERK3 qui complique l'étude de sa stabilité. Au cours de mon doctorat, alors que nous étudions l'effet des dommages à l'ADN sur l'expression de ERK3, nous avons remarqué que le simple fait de

sortir des cellules en culture de l'incubateur induit une diminution de l'expression protéique de ERK3. Cette observation a été réalisée dans plusieurs lignées cellulaires. Parallèlement à nos propres observations, Frank Brand, un étudiant au doctorat dans le laboratoire de Matthias Gaestel en Allemagne, un des rares autres laboratoires dans le monde à avoir étudié ERK3, a observé le même phénotype (Frank Brand, 2012 ; thèse doctorale). Il a ensuite déterminé que l'alcalinisation du milieu de culture des cellules en présence de l'atmosphère normale (en comparaison du milieu à 5% de CO<sub>2</sub> des incubateurs de cellules) induisait une dégradation de ERK3. De la même façon, le stress mécanique causé par la manipulation des flasques ou pétris de culture semble pouvoir causer une dérégulation de l'expression de la protéine. À l'inverse, l'acidification du milieu, ainsi que le traitement avec le chlorure de cobalt ou la staurosporine induit une accumulation de la protéine.

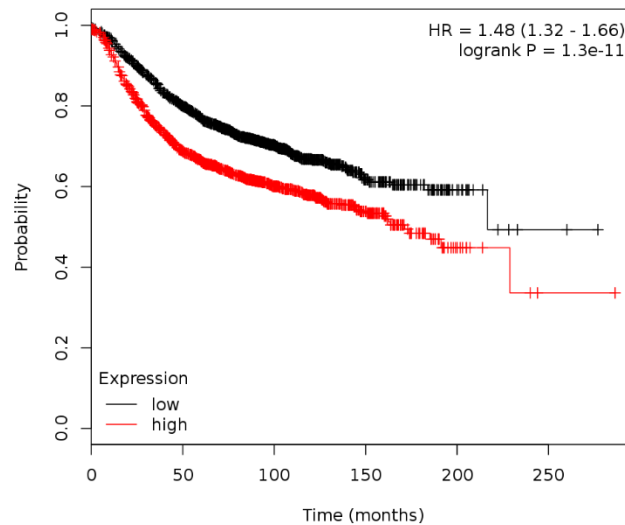
Nous avons tiré parti de ce mode de régulation lors de la caractérisation de la régulation de ERK3 par USP20 pour démontrer que dans un contexte où ERK3 s'accumule (nos travaux se sont concentrés sur le pH acide et le traitement au chlorure de cobalt) l'inhibition de l'activité de USP20 induisait une diminution de la stabilité de la protéine. Cependant, il s'agit d'une régulation qui complique considérablement l'étude de la protéine. Il faut alors toujours s'assurer de contrôler le pH du milieu dès que les cellules sont sorties de l'incubateur pour effectuer un traitement quelconque. Dans le cas contraire, il n'est pas possible de tirer de conclusion sur la pertinence biologique d'une observation puisque le système expérimental est artificiellement placé dans des conditions pro-dégradation pour ERK3. Il conviendrait donc d'analyser toutes les études publiées qui traitent de la régulation de ERK3 en regard de cette connaissance, afin de déterminer si les effets rapportés sont bien dus aux mécanismes proposés et non simplement causés par les procédures expérimentales.

## **4.2 Les fonctions de ERK3**

### 4.2.1 Le rôle de ERK3 comme promoteur de la migration cellulaire.

Dans l'étude des régulations de ERK3 par USP20, nous avons mis à jour un nouveau rôle pour ERK3 dans la régulation du cytosquelette d'actine et la promotion de la migration cellulaire, notamment dans une lignée cellulaire issue de cancer du sein. Parallèlement à nos résultats, une étude publiée rapporte le même phénotype dans des modèles similaires semblables (149). Notre choix d'étudier ce système provient de plusieurs indices laissant penser que ERK3 pouvait être impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine. Premièrement, le seul substrat physiologique bien caractérisé de ERK3 est MK5, qui est connue pour réguler l'organisation du cytosquelette d'actine *via* la phosphorylation de HSP27 (571). La signalisation ERK4-MK5-HSP27 a d'ailleurs été démontrée comme un régulateur de la polymérisation de l'actine et de la migration de cellules issues d'ostéosarcome U2OS (126). Deuxièmement, ERK3 est phosphorylée sur sa boucle d'activation par les kinases PAK1/2/3, qui sont des régulateurs bien connus de la migration cellulaire, notamment dans les modèles de cancer du sein (voir revue (572)). Finalement, il a récemment été démontré que la signalisation ERK3-MK5 régule la morphologie de dendrites neuronales de neurones de l'hippocampe, un processus dépendant de l'organisation du cytosquelette d'actine (125).

Nos travaux ont donc permis de montrer que ERK3 est un régulateur positif de la migration de cellules issues d'adénocarcinomes mammaires en culture. Quelle est l'importance relative de ce mécanisme *in vivo* ? Nous ne disposons pas de données expérimentales pour le déterminer. Toutefois, l'analyse de données mises en ligne par le consortium TCGA, nous indique que la forte expression de ERK3 est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein. (Figure 8). À l'inverse, l'analyse des mêmes groupes de données indique que l'expression de E6AP est positivement corrélée à un bon pronostic.

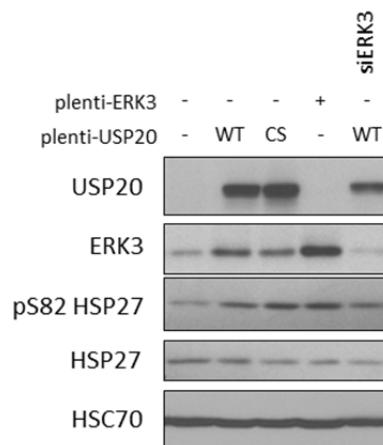


**Figure 7. ERK3 est un facteur de mauvais pronostic dans les cancers du sein.**

Copie d'écran d'une courbe de survie globale de Kaplan-Meier générée avec le logiciel en ligne KMplot à partir de données du consortium TCGA. Les niveaux d'expression de ERK3 sont séparés par la médiane.

Il convient bien évidemment de noter que ces données concernent uniquement l'expression de l'ARN messenger de ERK3 et non son expression protéique. Toutefois, au vu de la pression de dégradation qui existe sur ERK3, on peut difficilement penser que la simple surexpression de l'ARN messenger, si elle n'est pas accompagnée par des adaptations de la régulation protéique, induirait une augmentation majeure de l'abondance de la protéine. Dans ce contexte, il est particulièrement intéressant de noter que l'ubiquitine ligase E6AP a récemment été décrite comme un régulateur négatif de la migration et des métastases dans les cancers mammaires (573). De plus, à l'inverse de ERK3, l'analyse de données d'expression dans des tumeurs humaines indique que l'expression de E6AP est positivement corrélée à un bon pronostic, renforçant l'idée que E6AP est un régulateur négatif de ERK3 dans ce contexte. Il serait donc intéressant d'évaluer l'expression protéique de ERK3 dans différents types de cancers humains mammaires, à l'aide de « tissu micro-arrays » et de déterminer s'il existe une corrélation entre le phénotype plus ou moins invasif d'un cancer et l'expression protéique de ERK3. De plus, au vu du rôle déjà décrit de ERK3 dans l'invasion des cancers pulmonaires, il serait intéressant de réaliser une étude fonctionnelle pour déterminer si cette fonction existe aussi dans le contexte des cancers mammaires.

Quelle est le mécanisme cellulaire de la promotion de la migration par ERK3 ? Certaines données publiées suggèrent que ce rôle serait indépendant de l'activité kinase de la protéine, puisque l'expression d'un mutant inactif de ERK3 induit le même effet que l'expression de la protéine sauvage (149). Si cette information est confirmée, il s'agirait de la première mention d'une fonction kinase indépendante pour ERK3. La seule autre étude publiée qui a évaluée cette possibilité, à laquelle j'ai participé au cours de mon doctorat, a démontré que l'activité kinase de ERK3 est nécessaire à la maturation des thymocytes *in vivo* (21). Néanmoins, au vu du rôle décrit de la signalisation MK5-HSP27 dans le contrôle de la migration, l'hypothèse la plus probable pour le mécanisme cellulaire de la fonction de ERK3 dans la migration passe sans doute par l'activation de MK5. Nous avons de plus obtenus des résultats qui indiquent que le gain de fonction de ERK3 induit par la surexpression de USP20 induit une augmentation de la phosphorylation de HSP27 sur sa sérine 82, résidu décrit comme étant phosphorylé par MK5 (figure 9). L'hypothèse de l'existence d'une voie de signalisation USP20-ERK3-MK5-HSP27 régulant la migration cellulaire paraît donc une hypothèse qu'il serait intéressant de documenter.



**Figure 8. La signalisation USP20-ERK3 régule positivement la phosphorylation de HSP27 dans des cellules HeLa.**

Des cellules A549 ont été transfectées de manière transitoire avec les vecteurs d'expression et les siRNA indiqués. 36h après transfection la phosphorylation de HSP27 et l'expression de ERK3 ont été analysées par immunobuvardage.

#### 4.2.2 Le rôle de ERK3 dans la réparation de l'ADN.

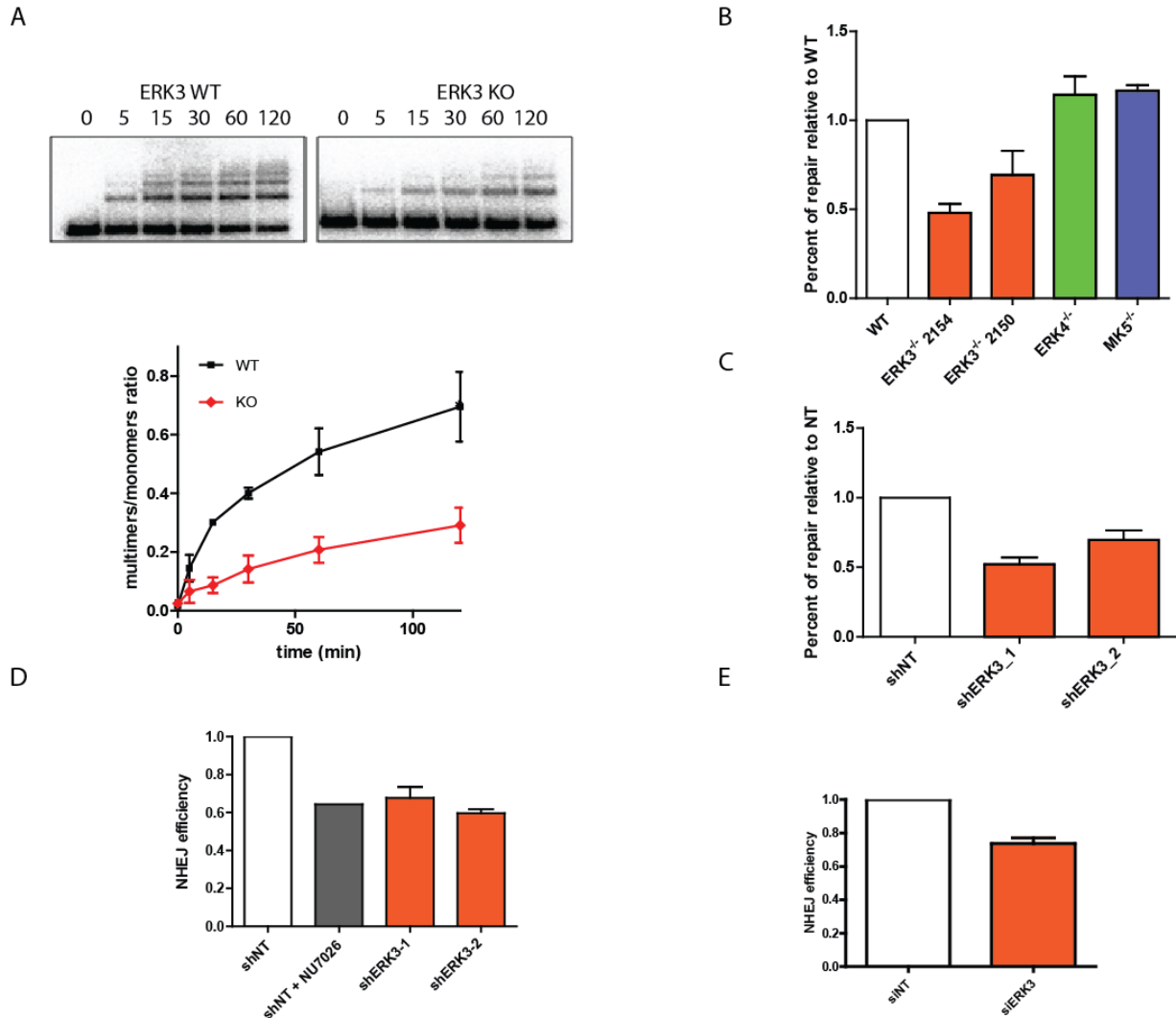


La réponse aux dommages à l'ADN en général, et la réparation de l'ADN en particulier, sont des points convergent de plusieurs données que nous avons recueillies au travers de nos études. Dans le chapitre 2, nous avons identifié USP20 comme un régulateur positif de ERK3. La protéine USP20 est activée en réponse aux dommages à l'ADN et régule positivement la signalisation Chk1 et la réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue (436, 535, 536). Comme discuté précédemment, nous avons observé que l'expression protéique de ERK3 est augmentée en réponse aux dommages à l'ADN de type UV. De plus, nous avons identifié un réseau de régulateurs potentiels de ERK3 centré autour des ubiquitines ligases RNF4 et BARD1 qui sont elles aussi connues pour avoir un rôle central dans la réponse aux dommages à l'ADN (574).

Il existe aussi des données fonctionnelles qui pointent vers un rôle fonctionnel de ERK3 dans la réponse aux dommages à l'ADN. Une étude publiée par le groupe de Nathalie Labrecque, à laquelle j'ai participé au cours de mon doctorat, décrit le phénotype de thymocytes déficients en ERK3 et montre que l'absence de la kinase induit une diminution des événements de recombinaison distaux de la chaîne  $\alpha$  du TCR (21). Ces résultats suggèrent que les thymocytes déficients en ERK3 sont moins à même de mener à bien la recombinaison V(D)J, un processus qui dépend en grande partie du bon fonctionnement de la machinerie de réparation des cassures double brin par jonction d'extrémité non-homologues (NHEJ pour « non-homologous end joining ») (voir revue (575)). De plus, une étude récente suggère aussi un rôle pour ERK3 dans la réponse aux dommages à l'ADN, notamment dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques inhibiteurs de la topoisomérase II (113). Finalement, les études d'identification des interacteurs de ERK3 à grande échelle ont fait apparaître comme une liaison potentielle entre la protéine et l'hétérodimère Ku70/Ku80, un des facteurs centraux de la réparation des cassures double brin par NHEJ (Kristel Bouttonet et Sylvain Meloche, données non publiées).

L'ensemble de ces informations permet de poser l'hypothèse que ERK3 joue un rôle dans la réparation et/ou la réponse aux dommages à l'ADN. En parallèle de mon travail principal de doctorat, j'ai consacré une partie de mes efforts de recherche à répondre à cette question. Les résultats que nous avons obtenus démontrent une implication de ERK3 dans le fonctionnement de la réparation des cassures double brin de l'ADN par NHEJ. En effet, l'absence de ERK3

induit une diminution de l'efficacité du fonctionnement du NHEJ dans un modèle *in vitro* (Figure 10A). Cet effet est observé dans des extraits nucléaires issus de fibroblastes embryonnaires murins (Figure 10B), mais aussi dans la lignée cellulaire humaine HCT116 (Figure 10C). De manière intéressante, cette fonction semble spécifique à ERK3 puisque la déficience en ERK4 n'induit pas le même phénotype (Figure 10B). De plus, il s'agit d'un rôle qui semble indépendant de MK5 puisque les extraits nucléaires issus de cellules MK5<sup>-/-</sup> ont le même potentiel de réparation que les extraits nucléaires issus de cellules normales (Figure 10B). Nous avons ensuite confirmé cette observation par des essais fonctionnels en cellules. Un essai d'intégration aléatoire de plasmide linéarisé comportant un gène de résistance à un antibiotique peut être utilisé comme un marqueur de l'efficacité du NHEJ dans des cellules (576). Nos résultats montrent que l'inhibition de l'expression de ERK3 induit une diminution de l'efficacité de l'intégration des plasmides, d'un niveau comparable à ce qui est observé lors du traitement avec le NU7026, un inhibiteur pharmacologique du NHEJ (Figure 10D) (577). Il est intéressant de noter que cet inhibiteur induit une sensibilisation aux drogues chimiothérapeutiques ciblant la topoisomérase II, un effet qui est aussi observé pour l'inhibition de ERK3 (113, 577).



**Figure 9. ERK3 régule l'efficacité de la réparation de l'ADN par NHEJ.**

(A) Exemple représentatif d'essais de NHEJ *in vitro* réalisés avec des extraits nucléaires de MEF ERK3 WT et ERK3 KO. (B, C) Quantification relative de l'efficacité maximale de NHEJ, mesurée à 120 min, dans les expériences *in vitro* réalisées avec des extraits nucléaires issus de fibroblastes embryonnaires murins (B) ou de lignées stables HCT116 exprimant les shRNA indiqués (C). (D) Des cellules HCT116 exprimant de manière stable les shRNA indiqués ont été soumises au test d'intégration aléatoire de plasmide (voir texte). (E) Le système rapporteur 293T-EJ5-GFP (voir réf. 578) a été utilisé avec des siRNA SMARTpool dirigés contre ERK3 et l'efficacité de réparation de l'ADN évaluée. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart-type d'un minimum de trois expériences indépendantes.

Finalement, en collaboration avec l'équipe de recherche de Jean-Yves Masson de l'université Laval, nous avons utilisé un essai rapporteur du NHEJ intra-chromosomique. Dans ce modèle un site de cassure double brin unique est induit par l'expression exogène d'une enzyme de restriction. La réparation de l'ADN par NHEJ induit l'expression d'une protéine GFP, permettant ainsi de quantifier l'efficacité de la réparation (578). Les résultats obtenus par l'équipe de Jean-Yves Masson montrent une diminution significative de la réparation de l'ADN par NHEJ lorsque l'expression de la protéine ERK3 est inhibée (Figure 10E). Les essais fonctionnels démontrent donc clairement que la présence de ERK3 est nécessaire pour que le processus de réparation des cassures double brin de l'ADN par NHEJ fonctionne de manière optimale *in vitro* et *ex vivo*. Quel est le mécanisme de cette fonction de ERK3 ? Il n'existe pas de démonstration expérimentale d'un mécanisme moléculaire. Dans la littérature, il a récemment été suggéré que la kinase ERK3 stimule l'activité de la phosphodiesterase de l'ADN TDP2 (113). Cette enzyme est principalement impliquée dans l'excision des adduits entre l'ADN et la topoisomérase II lorsque cette dernière est bloquée dans son activité, le plus souvent à cause d'un traitement par un agent chimiothérapeutique (579). Cette activité permet de libérer les extrémités de l'ADN pour permettre aux molécules du NHEJ de réparer la cassure double brin. Contrairement à TDP1 qui peut avoir des activités sur plusieurs types de liaisons phosphodiésters, TDP2 semble spécifique aux liaisons générées par l'inhibition de la topoisomérase II (579, 580). Il s'agit donc d'une activité qui n'est pas nécessaire à la réparation de l'ADN par NHEJ dans les modèles expérimentaux que nous avons utilisés, qui suggèrent un rôle de ERK3 dans le processus de NHEJ général. Le mécanisme moléculaire de la fonction de ERK3 dans la réparation de l'ADN reste donc à déterminer. Néanmoins, comme discuté précédemment, des données du laboratoire suggèrent une interaction avec des sous-unités du complexe DNAPK. Les interactions physiques et fonctionnelles entre ERK3 et ce complexe central de la machinerie de NHEJ mériteraient donc d'être étudiées.

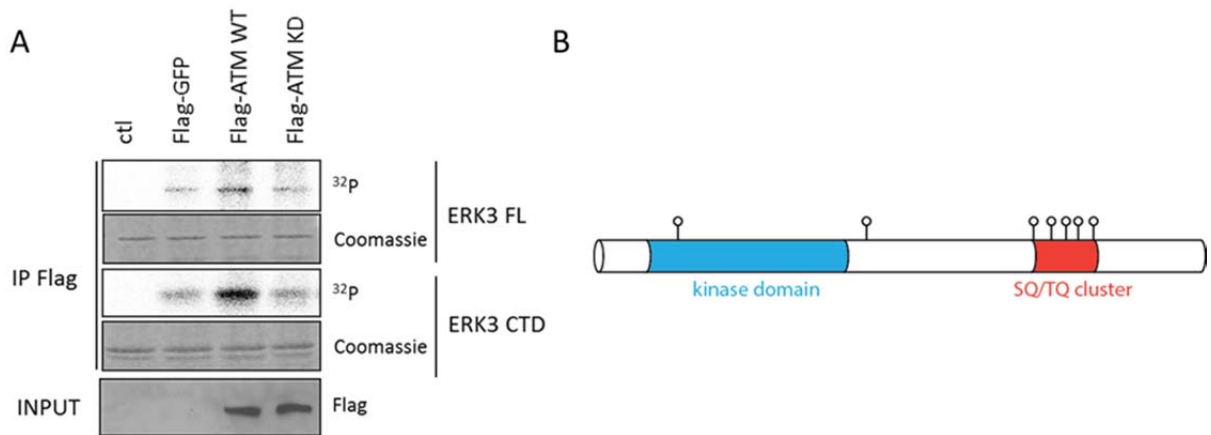
Au regard de cette nouvelle fonction pour ERK3, quelles sont les régulations de la protéine en réponse aux cassures double brin de l'ADN ? Il s'agit d'une question pour laquelle il n'existe pas de réponse satisfaisante dans l'état actuel des connaissances. Bien qu'interagissant avec le complexe DNAPK, ERK3 ne semble pas être localisée aux sites de cassures double

brin (J. Y. Masson, données non publiées). Toutefois, il convient de noter que ces expériences ont été réalisées avec une version de ERK3 fusionnée à la protéine fluorescente GFP en N-terminal, une pratique qui est documentée pour ne pas toujours refléter la localisation de la protéine endogène (581). D'autre part, nos résultats préliminaires n'ont pas permis de tirer de conclusions spécifiques à la question de l'expression protéique de ERK3 en réponse aux cassures double brin de l'ADN, étant donné la sensibilité de ERK3 aux changements de l'environnement causés par les manipulations expérimentales. En revanche, comme précédemment discuté, nos résultats indiquent une augmentation de l'abondance protéique de ERK3 en réponse à un dommage à l'ADN de type UV. Les dommages à l'ADN causés par les UV sont toutefois différents des cassures double brin et génèrent des événements de signalisation et de régulations distincts. En revanche, USP20 possède un rôle décrit dans la réparation des cassures double brin par la recombinaison homologue (436). Il est donc tentant de penser que la DUB pourrait réguler activement certaines protéines dans ce contexte.

L'identification des ubiquitines ligases RNF4 et BARD1 comme régulateurs négatifs de l'expression de ERK3 est un autre élément à considérer. La ligase RNF4 est un régulateur positif de la réparation des cassures double brin de l'ADN, notamment par son rôle de régulation de la dégradation du facteur de réponse aux dommages à l'ADN MDC1 (576). En revanche, l'activité de RNF4 ne semble pas moduler l'activité du NHEJ (582). La protéine BARD1 a de nombreuses fonctions dans la réponse aux dommages à l'ADN. Certaines de ces fonctions sont dépendantes de la formation du complexe ubiquitine ligase BRCA1/BARD1 qui régule positivement la réparation de l'ADN, d'autres sont indépendantes du complexe et régulent notamment l'apoptose induite par les stress génotoxiques (voir revue (583)). Il peut donc apparaître surprenant d'identifier ces protéines comme régulateurs potentiels de ERK3. Premièrement, nos expériences de cribles fonctionnels ont été réalisées dans un contexte où la réponse aux cassures double brin de l'ADN n'est pas induite. Deuxièmement, identifier des ubiquitines ligases activées par les dommages à l'ADN comme régulateurs négatifs d'une protéine qui semble jouer un rôle positif dans la réparation de ces dommages peut à première vue sembler contre-intuitif. Il s'agit en fait d'un mécanisme de régulation répandu chez les protéines de réponse aux dommages à l'ADN. La réparation de l'ADN est un processus qui fait intervenir de nombreux acteurs de manière séquentielle. Une fois leur fonction effectuée les protéines doivent être éliminées du site de la cassure pour permettre à la réparation de se

poursuivre. C'est ainsi qu'on peut observer que les protéines MDC1 ou Ku80 sont ubiquitinées et dégradées à la suite d'un dommage à l'ADN (576, 584). La cinétique précise d'ubiquitination et de dégradation de ERK3 en réponse à un dommage à l'ADN serait donc un élément important qui pourrait fournir des informations sur le rôle de la protéine dans ce processus.

Finalement, il existe un dernier élément qui pourrait donner des informations sur la régulation de ERK3 en réponse aux dommages à l'ADN. L'analyse de la séquence de la protéine ERK3 humaine fait apparaître 5 résidus sérine (S511, S539, S558, S571 et S595) suivis d'une glutamine dans un intervalle de 86 acides aminés au sein de l'extension C-terminale de la protéine. Cette concentration de sites SQ/TQ est une caractéristique commune des substrats des kinases centrales dans la réponse aux dommages à l'ADN ATM et ATR (585). Les domaines de concentrations de sites SQ/TQ (domaines SCD pour « SQ/TQ cluster domain ») sont définis comme une région possédant au moins trois sites dans un intervalle de 100 acides aminés.



**Figure 10. L'extension C-terminale de ERK3 est phosphorylée par la kinase ATM.**

(A) Essais kinase *in vitro* réalisés avec les kinases ATM-WT et ATM-KD immunoprécipitées à partir de lysats de cellules 293T transfectées avec les plasmides indiqués. (B) Représentation schématique de la protéine ERK3, avec les sites S/TQ indiqués et le domaine SCD mis en évidence.

De manière intéressante, si seulement trois des sites SQ/TQ de ERK3 sont complètement conservés au travers de l'évolution, la caractéristique de domaine SCD est présente chez la plupart des vertébrés. En accord avec ces données, nos résultats montrent que la kinase ATM phosphoryle la protéine ERK3 *in vitro* (Figure 11). De plus, l'extension C-terminale seule peut

elle aussi être phosphorylée par la kinase ATM, ce qui suggère que la phosphorylation cible un ou plusieurs sites du domaine SCD de ERK3. Curieusement, la phosphorylation C-terminale de la kinase ERK3 est connue pour moduler la stabilité de la protéine (138). Des travaux futurs devraient donc évaluer le rôle de cette phosphorylation de ERK3 dans le contrôle de sa stabilité, et les conséquences fonctionnelles de cette régulation dans la fonction de ERK3 associée à la réparation des dommages à l'ADN.

## Conclusion

La régulation de la stabilité de la protéine ERK3 par le protéasome est connue depuis longtemps. Au fil des ans, certaines des modalités de ce contrôle ont été découvertes, mettant en lumière les particularités et le dynamisme de ce processus. Ces données suggèrent un rôle primordial de la régulation de la stabilité de ERK3 dans le contrôle de ses fonctions physiologiques. Malgré l'importance de cette régulation dans la compréhension de la biologie de ERK3, au moment où j'ai commencé mes études de doctorat, l'identité des régulateurs de la stabilité de la protéine étaient inconnus.

Dans cette thèse, nous avons utilisé des approches fonctionnelles à grande échelle pour identifier les composantes du système ubiquitine-protéasome régulatrices de la stabilité de ERK3. Dans un premier temps, nous avons identifié la DUB USP20 comme un régulateur de l'expression protéique et de la stabilité de ERK3. Nos travaux ont permis de démontrer et de caractériser la relation enzyme-substrat entre USP20 et ERK3. La deuxième partie de nos travaux s'est concentrée sur l'identification des E3 ligases et E2 conjuguées qui régulent l'abondance protéique de ERK3. Parmi les régulateurs potentiels que nous avons identifiés, nos travaux se sont concentrés sur l'ubiquitine ligase E6AP. Nos données démontrent que E6AP régule l'expression et la stabilité de la protéine ERK3. De plus, nous avons montré qu'il existe une interaction physique entre les deux protéines et que E6AP est un régulateur positif de l'ubiquitination de ERK3.

Finalement, nous avons au travers de ces études identifié une nouvelle fonction pour ERK3 dans la régulation du cytosquelette d'actine et dans le contrôle de la migration cellulaire. Enfin, et surtout, nous avons pu démontrer que la DUB USP20 contrôle la fonction pro-migratoire de ERK3. Nos travaux, qui s'inscrivent dans l'hypothèse générale que la régulation de la stabilité de ERK3 est un des régulateurs majeurs de son activité biologique, ont donc permis d'apporter un élément de réponse positive à cette question.

En conclusion, nos travaux ont permis d'identifier certains régulateurs de la stabilité et de l'activité de ERK3 et fournissent des pistes d'étude pour mieux en comprendre les fonctions biologiques.



## Bibliographie

1. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews*. 1999;79(1):143-80.
2. Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR. 2011;75(1):50-83.
3. Ray LB, Sturgill TW. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(11):3753-7.
4. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991;65(4):663-75.
5. Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, et al. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science (New York, NY)*. 1990;249(4964):64-7.
6. Gonzalez FA, Raden DL, Davis RJ. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(33):22159-63.
7. Courcelles M, Fremin C, Voisin L, Lemieux S, Meloche S, Thibault P. Phosphoproteome dynamics reveal novel ERK1/2 MAP kinase substrates with broad spectrum of functions. *Molecular systems biology*. 2013;9:669.
8. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*. 2001;22(2):153-83.
9. Pagès G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(18):8319-23.
10. Voisin L, Saba-El-Leil MK, Julien C, Fremin C, Meloche S. Genetic demonstration of a redundant role of extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 mitogen-activated protein kinases in promoting fibroblast proliferation. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(12):2918-32.
11. Yamamoto T, Ebisuya M, Ashida F, Okamoto K, Yonehara S, Nishida E. Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Current biology : CB*. 2006;16(12):1171-82.
12. Ussar S, Voss T. MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(42):43861-9.
13. Gysin S, Lee SH, Dean NM, McMahon M. Pharmacologic inhibition of RAF-->MEK-->ERK signaling elicits pancreatic cancer cell cycle arrest through induced expression of p27Kip1. *Cancer Res*. 2005;65.
14. Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, et al. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *The EMBO journal*. 1995;14(5):951-62.

15. Murphy LO, Smith S, Chen RH, Finger DC, Blenis J. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature cell biology*. 2002;4(8):556-64.
16. Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, Yaniv M. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *The EMBO journal*. 2000;19(9):2056-68.
17. Kovary K, Bravo R. The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Molecular and cellular biology*. 1991;11(9):4466-72.
18. Fujita N, Sato S, Tsuruo T. Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(49):49254-60.
19. Frémin C, Meloche S. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*. 2010;3:8-.
20. Fischer AM, Katayama CD, Pages G, Pouyssegur J, Hedrick SM. The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity*. 2005;23(4):431-43.
21. Marquis M, Daudelin JF, Boulet S, Sirois J, Crain K, Mathien S, et al. The catalytic activity of the mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 3 is required to sustain CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocyte survival. *Molecular and cellular biology*. 2014;34(18):3374-87.
22. Sirois J, Daudelin JF, Boulet S, Marquis M, Meloche S, Labrecque N. The atypical MAPK ERK3 controls positive selection of thymocytes. *Immunology*. 2015;145(1):161-9.
23. Ying Q-L, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 2008;453(7194):519-23.
24. Rauen KA. The RASopathies. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2013;14(1):355-69.
25. Fremin C, Saba-El-Leil MK, Levesque K, Ang SL, Meloche S. Functional Redundancy of ERK1 and ERK2 MAP Kinases during Development. *Cell reports*. 2015;12(6):913-21.
26. Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*. 1994;77(6):841-52.
27. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes & development*. 1998;12(19):3008-19.
28. Kyriakis JM, Avruch J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(28):17355-63.
29. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & development*. 1993;7(11):2135-48.
30. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 1994;76(6):1025-37.
31. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 1994;369(6476):156-60.
32. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO journal*. 1996;15(11):2760-70.

33. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science (New York, NY)*. 1994;265(5173):808-11.
34. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 1994;372(6508):739-46.
35. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 1994;78(6):1027-37.
36. Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, et al. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(30):17920-6.
37. Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, Cohen P. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *The EMBO journal*. 1997;16(12):3563-71.
38. Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, et al. Characterization of the Structure and Function of the Fourth Member of p38 Group Mitogen-activated Protein Kinases, p38delta. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(48):30122-8.
39. Mertens S, Craxton M, Goedert M. SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS letters*. 1996;383(3):273-6.
40. Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Møller NP, Ullrich A. ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(9):4355-9.
41. Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*. 1991;353(6345):670-4.
42. Smeal T, Binetruy B, Mercola DA, Birrer M, Karin M. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*. 1991;354(6353):494-6.
43. Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam SY, Bauer A, Karin M, Wagner EF. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Molecular cell*. 2004;15(5):713-25.
44. Jaeschke A, Karasarides M, Ventura JJ, Ehrhardt A, Zhang C, Flavell RA, et al. JNK2 is a positive regulator of the cJun transcription factor. *Molecular cell*. 2006;23(6):899-911.
45. Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(34):20608-16.
46. Mikhailov A, Shinohara M, Rieder CL. Topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors delay the G2/M transition by triggering the p38 MAPK checkpoint pathway. *The Journal of cell biology*. 2004;166(4):517-26.
47. Bulavin DV, Higashimoto Y, Popoff IJ, Gaarde WA, Basrur V, Potapova O, et al. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature*. 2001;411(6833):102-7.
48. Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, et al. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *The EMBO journal*. 1999;18(23):6845-54.

49. Hui L, Bakiri L, Mairhorfer A, Schweifer N, Haslinger C, Kenner L, et al. p38[alpha] suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nat Genet.* 2007;39(6):741-9.
50. Kang YJ, Chen J, Otsuka M, Mols J, Ren S, Wang Y, et al. Macrophage deletion of p38alpha partially impairs lipopolysaccharide-induced cellular activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2008;180(7):5075-82.
51. Kim C, Sano Y, Todorova K, Carlson BA, Arpa L, Celada A, et al. The kinase p38[alpha] serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. *Nat Immunol.* 2008;9(9):1019-27.
52. Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, et al. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *The Journal of clinical investigation.* 2001;108(1):73-81.
53. Roy PK, Rashid F, Bragg J, Ibdah JA. Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG.* 2008;14(2):200-2.
54. Han Myoung S, Barrett T, Brehm Michael A, Davis Roger J. Inflammation Mediated by JNK in Myeloid Cells Promotes the Development of Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cell reports.* 2016;15(1):19-26.
55. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimmual A, et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science (New York, NY).* 2000;288(5467):870-4.
56. Sanchez-Prieto R, Rojas JM, Taya Y, Gutkind JS. A Role for the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in the Transcriptional Activation of p53 on Genotoxic Stress by Chemotherapeutic Agents. *Cancer Research.* 2000;60(9):2464-72.
57. Poizat C, Puri PL, Bai Y, Kedes L. Phosphorylation-Dependent Degradation of p300 by Doxorubicin-Activated p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Cardiac Cells. *Molecular and cellular biology.* 2005;25(7):2673-87.
58. Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer cell.* 2007;11(2):191-205.
59. Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, et al. Phosphorylation by p38 MAPK as an Alternative Pathway for GSK3 $\beta$  Inactivation. *Science (New York, NY).* 2008;320(5876):667-70.
60. Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC, Bagnulo R, et al. A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell death and differentiation.* 2007;14(4):693-702.
61. English JM, Vanderbilt CA, Xu S, Marcus S, Cobb MH. Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *The Journal of biological chemistry.* 1995;270(48):28897-902.
62. Lee JD, Ulevitch RJ, Han J. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochemical and biophysical research communications.* 1995;213(2):715-24.
63. Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *The Journal of biological chemistry.* 1995;270(21):12665-9.
64. Yan C, Luo H, Lee JD, Abe J, Berk BC. Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(14):10870-8.

65. Mulloy R, Salinas S, Philips A, Hipkind RA. Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. *Oncogene*. 2003;22(35):5387-98.
66. Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature*. 1998;395(6703):713-6.
67. Ranganathan A, Pearson GW, Chrestensen CA, Sturgill TW, Cobb MH. The MAP kinase ERK5 binds to and phosphorylates p90 RSK. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2006;449(1-2):8-16.
68. Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(14):9248-53.
69. Sohn SJ, Sarvis BK, Cado D, Winoto A. ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(45):43344-51.
70. Yan L, Carr J, Ashby PR, Murry-Tait V, Thompson C, Arthur JS. Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC developmental biology*. 2003;3:11.
71. Hayashi M, Fearn C, Eliceiri B, Yang Y, Lee JD. Big mitogen-activated protein kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway is essential for tumor-associated angiogenesis. *Cancer Research*. 2005;65(17):7699-706.
72. Simoes AE, Rodrigues CM, Borralho PM. The MEK5/ERK5 signalling pathway in cancer: a promising novel therapeutic target. *Drug discovery today*. 2016;21(10):1654-63.
73. Coulombe P, Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1773(8):1376-87.
74. Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R, Kahle KT, Hershenson MB, Le Beau MM, et al. ERK8, a New Member of the Mitogen-activated Protein Kinase Family. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(19):16733-43.
75. Abe MK, Kahle KT, Saelzler MP, Orth K, Dixon JE, Rosner MR. ERK7 Is an Autoactivated Member of the MAPK Family. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(24):21272-9.
76. Brott BK, Pinsky BA, Erikson RL. Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(3):963-8.
77. Choi KW, Benzer S. Rotation of photoreceptor clusters in the developing *Drosophila* eye requires the nemo gene. *Cell*. 1994;78(1):125-36.
78. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, et al. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*. 1999;399(6738):798-802.
79. Kojima H, Sasaki T, Ishitani T, Iemura S, Zhao H, Kaneko S, et al. STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(12):4524-9.
80. Yuan HX, Wang Z, Yu FX, Li F, Russell RC, Jewell JL, et al. NLK phosphorylates Raptor to mediate stress-induced mTORC1 inhibition. *Genes & development*. 2015;29(22):2362-76.

81. Ota S, Ishitani S, Shimizu N, Matsumoto K, Itoh M, Ishitani T. NLK positively regulates Wnt/beta-catenin signalling by phosphorylating LEF1 in neural progenitor cells. *The EMBO journal*. 2012;31(8):1904-15.
82. Kim S, Kim Y, Lee J, Chung J. Regulation of FOXO1 by TAK1-nemo-like kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(11):8122-9.
83. Kanei-Ishii C, Ninomiya-Tsuji J, Tanikawa J, Nomura T, Ishitani T, Kishida S, et al. Wnt-1 signal induces, phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes and Development*. 2004;18(7):816-29.
84. Meneghini MD, Ishitani T, Carter JC, Hisamoto N, Ninomiya-Tsuji J, Thorpe CJ, et al. Map kinase and Wnt pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1999;399(6738):793-7.
85. Rocheleau CE, Yasuda J, Tae Ho S, Lin R, Sawa H, Okano H, et al. WRM-1 activates the LIT-1 protein kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in *C. elegans*. *Cell*. 1999;97(6):717-26.
86. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(4):1379-89.
87. Ota S, Ishitani S, Shimizu N, Matsumoto K, Itoh M, Ishitani T. NLK positively regulates Wnt/ $\beta$ -catenin signalling by phosphorylating LEF1 in neural progenitor cells. *The EMBO journal*. 2012;31(8):1904-15.
88. Ishitani T, Hirao T, Suzuki M, Isoda M, Ishitani S, Harigaya K, et al. Nemo-like kinase suppresses Notch signalling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex. *Nature cell biology*. 2010;12(3):278-85.
89. Kortenjann M, Nehls M, Smith AJ, Carsetti R, Schuler J, Kohler G, et al. Abnormal bone marrow stroma in mice deficient for nemo-like kinase, Nlk. *European journal of immunology*. 2001;31(12):3580-7.
90. Abe MK, Kuo WL, Hersenson MB, Rosner MR. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(2):1301-12.
91. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, NY)*. 2002;298(5600):1912-34.
92. Miyatake K, Kusakabe M, Takahashi C, Nishida E. ERK7 regulates ciliogenesis by phosphorylating the actin regulator CapZIP in cooperation with Dishevelled. *Nature communications*. 2015;6:6666.
93. Klevernic IV, Stafford MJ, Morrice N, Pegg M, Morton S, Cohen P. Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8. *The Biochemical journal*. 2006;394(Pt 1):365-73.
94. Groehler AL, Lannigan DA. A chromatin-bound kinase, ERK8, protects genomic integrity by inhibiting HDM2-mediated degradation of the DNA clamp PCNA. *The Journal of cell biology*. 2010;190(4):575-86.
95. Henrich LM, Smith JA, Kitt D, Errington TM, Nguyen B, Traish AM, et al. Extracellular signal-regulated kinase 7, a regulator of hormone-dependent estrogen receptor destruction. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(17):5979-88.

96. Saelzler MP, Spackman CC, Liu Y, Martinez LC, Harris JP, Abe MK. ERK8 down-regulates transactivation of the glucocorticoid receptor through Hic-5. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(24):16821-32.
97. Rossi M, Colecchia D, Iavarone C, Strambi A, Piccioni F, Verrotti di Pianella A, et al. Extracellular signal-regulated kinase 8 (ERK8) controls estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) cellular localization and inhibits its transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(10):8507-22.
98. Zacharogianni M, Kondylis V, Tang Y, Farhan H, Xanthakis D, Fuchs F, et al. ERK7 is a negative regulator of protein secretion in response to amino-acid starvation by modulating Sec16 membrane association. *The EMBO journal*. 2011;30(18):3684-700.
99. Hasygar K, Hietakangas V. p53- and ERK7-dependent ribosome surveillance response regulates *Drosophila* insulin-like peptide secretion. *PLoS genetics*. 2014;10(11):e1004764.
100. Colecchia D, Rossi M, Sasdelli F, Sanzone S, Strambi A, Chiariello M. MAPK15 mediates BCR-ABL1-induced autophagy and regulates oncogene-dependent cell proliferation and tumor formation. *Autophagy*. 2015;11(10):1790-802.
101. Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR, Davis RJ. Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS letters*. 1992;304(2-3):170-8.
102. Meloche S, Beatty BG, Pellerin J. Primary structure, expression and chromosomal locus of a human homolog of rat ERK3. *Oncogene*. 1996;13(7):1575-9.
103. Zhu AX, Zhao Y, Moller DE, Flier JS. Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(12):8202-11.
104. Turgeon B, Saba-El-Leil MK, Meloche S. Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa. *The Biochemical journal*. 2000;346 Pt 1:169-75.
105. Bind E, Kleyner Y, Skowronska-Krawczyk D, Bien E, Dynlacht BD, Sánchez I. A Novel Mechanism for Mitogen-activated Protein Kinase Localization. *Molecular Biology of the Cell*. 2004;15(10):4457-66.
106. Åberg E, Perander M, Johansen B, Julien C, Meloche S, Keyse SM, et al. Regulation of MAPK-activated Protein Kinase 5 Activity and Subcellular Localization by the Atypical MAPK ERK4/MAPK4. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(46):35499-510.
107. Boulton TG, Cobb MH. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul*. 1991;2(5):357-71.
108. Peng X, Angelastro JM, Greene LA. Tyrosine phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase 4 in response to growth factors. *Journal of neurochemistry*. 1996;66(3):1191-7.
109. Hansen CA, Bartek J, Jensen S. A functional link between the human cell cycle-regulatory phosphatase Cdc14A and the atypical mitogen-activated kinase Erk3. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2008;7(3):325-34.
110. Sun M, Wei Y, Yao L, Xie J, Chen X, Wang H, et al. Identification of extracellular signal-regulated kinase 3 as a new interaction partner of cyclin D3. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;340(1):209-14.
111. Cheng M, Boulton TG, Cobb MH. ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(15):8951-8.
112. Long W, Foulds CE, Qin J, Liu J, Ding C, Lonard DM, et al. ERK3 signals through SRC-3 coactivator to promote human lung cancer cell invasion. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(5):1869-80.

113. Bian K, Muppani NR, Elkhadragy L, Wang W, Zhang C, Chen T, et al. ERK3 regulates TDP2-mediated DNA-damage response and chemoresistance in lung cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(6):6665-75.
114. Deleris P, Rousseau J, Coulombe P, Rodier G, Tanguay PL, Meloche S. Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5. *Journal of cellular physiology*. 2008;217(3):778-88.
115. Schumacher S, Laass K, Kant S, Shi Y, Visel A, Gruber AD, et al. Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *The EMBO journal*. 2004;23(24):4770-9.
116. Seternes OM, Mikalsen T, Johansen B, Michaelsen E, Armstrong CG, Morrice NA, et al. Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *The EMBO journal*. 2004;23(24):4780-91.
117. Kant S, Schumacher S, Singh MK, Kispert A, Kotlyarov A, Gaestel M. Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(46):35511-9.
118. Perander M, Aberg E, Johansen B, Dreyer B, Guldvik IJ, Outzen H, et al. The Ser(186) phospho-acceptor site within ERK4 is essential for its ability to interact with and activate PRAK/MK5. *The Biochemical journal*. 2008;411(3):613-22.
119. Aberg E, Torgersen KM, Johansen B, Keyse SM, Perander M, Seternes OM. Docking of PRAK/MK5 to the atypical MAPKs ERK3 and ERK4 defines a novel MAPK interaction motif. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(29):19392-401.
120. Sun P, Yoshizuka N, New L, Moser BA, Li Y, Liao R, et al. PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell*. 2007;128(2):295-308.
121. Yoshizuka N, Lai M, Liao R, Cook R, Xiao C, Han J, et al. PRAK suppresses oncogenic ras-induced hematopoietic cancer development by antagonizing the JNK pathway. *Molecular cancer research : MCR*. 2012;10(6):810-20.
122. Zheng H, Seit-Nebi A, Han X, Aslanian A, Tat J, Liao R, et al. A posttranslational modification cascade involving p38, Tip60, and PRAK mediates oncogene-induced senescence. *Molecular cell*. 2013;50(5):699-710.
123. Kress TR, Cannell IG, Brenkman AB, Samans B, Gaestel M, Roepman P, et al. The MK5/PRAK kinase and Myc form a negative feedback loop that is disrupted during colorectal tumorigenesis. *Molecular cell*. 2011;41(4):445-57.
124. Ronkina N, Johansen C, Bohlmann L, Lafera J, Menon MB, Tiedje C, et al. Comparative Analysis of Two Gene-Targeting Approaches Challenges the Tumor-Suppressive Role of the Protein Kinase MK5/PRAK. *PloS one*. 2015;10(8):e0136138.
125. Brand F, Schumacher S, Kant S, Menon MB, Simon R, Turgeon B, et al. The extracellular signal-regulated kinase 3 (mitogen-activated protein kinase 6 [MAPK6])-MAPK-activated protein kinase 5 signaling complex regulates septin function and dendrite morphology. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(13):2467-78.
126. Stohr N, Kohn M, Lederer M, Glass M, Reinke C, Singer RH, et al. IGF2BP1 promotes cell migration by regulating MK5 and PTEN signaling. *Genes & development*. 2012;26(2):176-89.
127. Klinger S, Turgeon B, Levesque K, Wood GA, Aagaard-Tillery KM, Meloche S. Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(39):16710-5.



128. Rosenberg A. The IUGR newborn. *Seminars in perinatology*. 2008;32(3):219-24.
129. Cuevas Guaman M, Sbrana E, Shope C, Showalter L, Hu M, Meloche S, et al. Administration of antenatal glucocorticoids and postnatal surfactant ameliorates respiratory distress syndrome-associated neonatal lethality in Erk3(-/-) mouse pups. *Pediatric research*. 2014;76(1):24-32.
130. Pew BK, Harris RA, Sbrana E, Guaman MC, Shope C, Chen R, et al. Structural and transcriptomic response to antenatal corticosteroids in an Erk3-null mouse model of respiratory distress. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2016;215(3):384.e1-.e89.
131. Constancia M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*. 2002;417(6892):945-8.
132. Silva D, Venihaki M, Guo W-H, Lopez MF. Igf2 Deficiency Results in Delayed Lung Development at the End of Gestation. *Endocrinology*. 2006;147(12):5584-91.
133. Rousseau J, Klinger S, Rachalski A, Turgeon B, Deleris P, Vigneault E, et al. Targeted inactivation of Mapk4 in mice reveals specific nonredundant functions of Erk3/Erk4 subfamily mitogen-activated protein kinases. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(24):5752-63.
134. Coulombe P, Rodier G, Pelletier S, Pellerin J, Meloche S. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(13):4542-58.
135. Julien C, Coulombe P, Meloche S. Nuclear export of ERK3 by a CRM1-dependent mechanism regulates its inhibitory action on cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(43):42615-24.
136. Xiang Z, Wang S, Xiang Y. Up-regulated microRNA499a by hepatitis B virus induced hepatocellular carcinogenesis via targeting MAPK6. *PloS one*. 2014;9(10):e111410.
137. Wang W, Bian K, Vallabhaneni S, Zhang B, Wu RC, O'Malley BW, et al. ERK3 promotes endothelial cell functions by upregulating SRC-3/SP1-mediated VEGFR2 expression. *Journal of cellular physiology*. 2014;229(10):1529-37.
138. Tanguay PL, Rodier G, Meloche S. C-terminal domain phosphorylation of ERK3 controlled by Cdk1 and Cdc14 regulates its stability in mitosis. *The Biochemical journal*. 2010;428(1):103-11.
139. Yoshizuka N, Chen RM, Xu Z, Liao R, Hong L, Hu W-Y, et al. A Novel Function of p38-Regulated/Activated Kinase in Endothelial Cell Migration and Tumor Angiogenesis. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(3):606-18.
140. Rai R, Mahale A, Saranath D. Molecular cloning, isolation and characterisation of ERK3 gene from chewing-tobacco induced oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2004;40(7):705-12.
141. Wang Q, Ding Q, Dong Z, Ehlers RA, Evers BM. Downregulation of mitogen-activated protein kinases in human colon cancers. *Anticancer research*. 2000;20(1a):75-83.
142. Liang B, Wang S, Zhu XG, Yu YX, Cui ZR, Yu YZ. Increased expression of mitogen-activated protein kinase and its upstream regulating signal in human gastric cancer. *World journal of gastroenterology*. 2005;11(5):623-8.
143. Evtimova V, Schwirzke M, Tarbe N, Burtscher H, Jarsch M, Kaul S, et al. Identification of breast cancer metastasis-associated genes by chip technology. *Anticancer research*. 2001;21(6a):3799-806.

144. Nambiar S, Mirmohammadsadegh A, Doroudi R, Gustrau A, Marini A, Roeder G, et al. Signaling networks in cutaneous melanoma metastasis identified by complementary DNA microarrays. *Archives of dermatology*. 2005;141(2):165-73.
145. Hoeflich KP, Eby MT, Forrest WF, Gray DC, Tien JY, Stern HM, et al. Regulation of ERK3/MAPK6 expression by BRAF. *International journal of oncology*. 2006;29(4):839-49.
146. Makitie AA, Pintor Dos Reis P, Arora S, Macmillan C, Warner GC, Sukhai M, et al. Molecular characterization of salivary gland malignancy using the Smgb-Tag transgenic mouse model. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2005;85(8):947-61.
147. Lee S, Kang J, Cho M, Seo E, Choi H, Kim E, et al. Profiling of transcripts and proteins modulated by K-ras oncogene in the lung tissues of K-ras transgenic mice by omics approaches. *International journal of oncology*. 2009;34(1):161-72.
148. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling*. 2013;6(269):p11.
149. Al-Mahdi R, Babteen N, Thillai K, Holt M, Johansen B, Wetting HL, et al. A novel role for atypical MAPK kinase ERK3 in regulating breast cancer cell morphology and migration. *Cell adhesion & migration*. 2015;9(6):483-94.
150. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis Assays: A Critical Overview. *Clinical Chemistry*. 2003;49(1):32-40.
151. Kress TR, Raabe T, Feller SM. High Erk activity suppresses expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in colorectal cancer cells. *Cell Communication and Signaling*. 2010;8(1):1.
152. Bode AM, Dong Z. The functional contrariety of JNK. *Molecular carcinogenesis*. 2007;46(8):591-8.
153. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B, et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO journal*. 1996;15(11):2760-70.
154. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(8):537-49.
155. Mateescu B, Batista L, Cardon M, Gruosso T, de Feraudy Y, Mariani O, et al. miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. *Nat Med*. 2011;17(12):1627-35.
156. Liu L, Cavanaugh JE, Wang Y, Sakagami H, Mao Z, Xia Z. ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8532-7.
157. Montero JC, Ocana A, Abad M, Ortiz-Ruiz MJ, Pandiella A, Esparis-Ogando A. Expression of Erk5 in early stage breast cancer and association with disease free survival identifies this kinase as a potential therapeutic target. *PloS one*. 2009;4(5):e5565.
158. Zen K, Yasui K, Nakajima T, Zen Y, Zen K, Gen Y, et al. ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating mitotic entry. *Genes, chromosomes & cancer*. 2009;48(2):109-20.
159. Akao Y, Nakagawa Y, Kitade Y, Kinoshita T, Naoe T. Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies. *Cancer science*. 2007;98(12):1914-20.

160. Clape C, Fritz V, Henriquet C, Apparailly F, Fernandez PL, Iborra F, et al. miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice. *PloS one*. 2009;4(10):e7542.
161. Noguchi S, Mori T, Hoshino Y, Maruo K, Yamada N, Kitade Y, et al. MicroRNA-143 functions as a tumor suppressor in human bladder cancer T24 cells. *Cancer letters*. 2011;307(2):211-20.
162. Zhang Y, Peng C, Wu G, Wang Y, Liu R, Yang S, et al. Expression of NLK and its potential effect in ovarian cancer chemotherapy. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2011;21(8):1380-7.
163. Huang Y, Jiang Y, Lu W, Zhang Y. Nemo-Like Kinase Associated with Proliferation and Apoptosis by c-Myb Degradation in Breast Cancer. *PloS one*. 2013;8(7):e69148.
164. Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R, 3rd, Kahle KT, Hershenson MB, Le Beau MM, et al. ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(19):16733-43.
165. Jin DH, Lee J, Kim KM, Kim S, Kim DH, Park J. Overexpression of MAPK15 in gastric cancer is associated with copy number gain and contributes to the stability of c-Jun. *Oncotarget*. 2015;6(24):20190-203.
166. Kling DE, Brandon KL, Sollinger CA, Cavicchio AJ, Ge Q, Kinane TB, et al. Distribution of ERK1/2 and ERK3 during normal rat fetal lung development. *Anatomy and embryology*. 2006;211(2):139-53.
167. Kleines M, Gartner A, Ritter K, Schaade L. Early steps in termination of the immortalization state in Burkitt lymphoma: induction of genes involved in signal transduction, transcription, and trafficking by the ganglioside IV(3)NeuAc-nLcOse(4)Cer. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1492(1):139-44.
168. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007;26(22):3100-12.
169. Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2009;8(5):705-11.
170. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, et al. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*. 1992;70(3):431-42.
171. Okada S, Pessin JE. Interactions between Src homology (SH) 2/SH3 adapter proteins and the guanylnucleotide exchange factor SOS are differentially regulated by insulin and epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(41):25533-8.
172. Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(5):281-98.
173. Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *The EMBO journal*. 1999;18(3):664-74.
174. Therrien M, Chang HC, Solomon NM, Karim FD, Wassarman DA, Rubin GM. KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell*. 1995;83(6):879-88.
175. Nguyen A, Burack WR, Stock JL, Kortum R, Chaika OV, Afkarian M, et al. Kinase Suppressor of Ras (KSR) Is a Scaffold Which Facilitates Mitogen-Activated Protein Kinase Activation In Vivo. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(9):3035-45.
176. Therrien M, Michaud NR, Rubin GM, Morrison DK. KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes & development*. 1996;10(21):2684-95.

177. Stewart S, Sundaram M, Zhang Y, Lee J, Han M, Guan K-L. Kinase Suppressor of Ras Forms a Multiprotein Signaling Complex and Modulates MEK Localization. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(8):5523-34.
178. Roy F, Laberge G, Douziech M, Ferland-McCollough D, Therrien M. KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes & development*. 2002;16(4):427-38.
179. McKay MM, Ritt DA, Morrison DK. Signaling dynamics of the KSR1 scaffold complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(27):11022-7.
180. Razidlo GL, Kortum RL, Haferbier JL, Lewis RE. Phosphorylation regulates KSR1 stability, ERK activation, and cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(46):47808-14.
181. Brown MD, Sacks DB. Protein Scaffolds in MAP Kinase Signalling. *Cellular signalling*. 2009;21(4):462-9.
182. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical journal*. 2010;429(3):403-17.
183. Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY, Ng DC. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1804(3):463-75.
184. Yamauchi J, Itoh H, Shinoura H, Miyamoto Y, Hirasawa A, Kaziro Y, et al. Involvement of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in alpha1B-adrenergic receptor/Galphaq-induced inhibition of cell proliferation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;281(4):1019-23.
185. Burdon D, Patel R, Challiss RA, Blank JL. Growth inhibition by the muscarinic M(3) acetylcholine receptor: evidence for p21(Cip1/Waf1) involvement in G(1) arrest. *The Biochemical journal*. 2002;367(Pt 2):549-59.
186. Grimsey NJ, Aguilar B, Smith TH, Le P, Soohoo AL, Puthenveedu MA, et al. Ubiquitin plays an atypical role in GPCR-induced p38 MAP kinase activation on endosomes. *The Journal of cell biology*. 2015;210(7):1117-31.
187. Stein B, Brady H, Yang MX, Young DB, Barbosa MS. Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase cascade. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(19):11427-33.
188. Han J, Lee JD, Jiang Y, Li Z, Feng L, Ulevitch RJ. Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(6):2886-91.
189. Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science (New York, NY)*. 1995;267(5198):682-5.
190. Enslen H, Raingeaud J, Davis RJ. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(3):1741-8.
191. Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura JJ, Kelkar N, Tanaka Y, et al. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes & development*. 2003;17(16):1969-78.
192. Pattison MJ, Mitchell O, Flynn HR, Chen C-S, Yang H-T, Ben-Addi H, et al. TLR and TNF-R1 activation of the MKK3/MKK6-p38 $\alpha$  axis in macrophages is mediated by TPL-2 kinase. *Biochemical Journal*. 2016;473(18):2845-61.

193. Lawler S, Fleming Y, Goedert M, Cohen P. Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Current biology : CB*. 1998;8(25):1387-90.
194. Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, et al. MAPKK-Independent Activation of p38 $\alpha$  Mediated by TAB1-Dependent Autophosphorylation of p38 $\alpha$ . *Science (New York, NY)*. 2002;295(5558):1291-4.
195. De Nicola GF, Martin ED, Chaikuad A, Bassi R, Clark J, Martino L, et al. Mechanism and consequence of the autoactivation of p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase promoted by TAB1. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(10):1182-90.
196. Cheung PC, Campbell DG, Nebreda AR, Cohen P. Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38 $\alpha$ . *The EMBO journal*. 2003;22(21):5793-805.
197. Muniyappa H, Das KC. Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580: a MLK-3-MKK7-dependent mechanism. *Cell Signal*. 2008;20(4):675-83.
198. Perdiguero E, Ruiz-Bonilla V, Gresh L, Hui L, Ballestar E, Sousa-Victor P, et al. Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38 $\alpha$  in abrogating myoblast proliferation. *The EMBO journal*. 2007;26(5):1245-56.
199. Stepniak E, Ricci R, Eferl R, Sumara G, Sumara I, Rath M, et al. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes & development*. 2006;20(16):2306-14.
200. Wang X, Finegan KG, Robinson AC, Knowles L, Khosravi-Far R, Hinchliffe KA, et al. Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress. *Cell death and differentiation*. 2006;13(12):2099-108.
201. Suzuki T, Yang J. Hydrogen peroxide activation of ERK5 confers resistance to Jurkat cells against apoptosis induced by the extrinsic pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;444(2):248-53.
202. Kesavan K, Lobel-Rice K, Sun W, Lapadat R, Webb S, Johnson GL, et al. MEKK2 regulates the coordinate activation of ERK5 and JNK in response to FGF-2 in fibroblasts. *Journal of cellular physiology*. 2004;199(1):140-8.
203. Roberts OL, Holmes K, Muller J, Cross DA, Cross MJ. ERK5 is required for VEGF-mediated survival and tubular morphogenesis of primary human microvascular endothelial cells. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 18):3189-200.
204. Garcia L, Garcia F, Llorens F, Unzeta M, Itarte E, Gómez N. PP1/PP2A phosphatases inhibitors okadaic acid and calyculin A block ERK5 activation by growth factors and oxidative stress. *FEBS letters*. 2002;523(1-3):90-4.
205. Chao TH, Hayashi M, Tapping RI, Kato Y, Lee JD. MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(51):36035-8.
206. Sun W, Kesavan K, Schaefer BC, Garrington TP, Ware M, Johnson NL, et al. MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(7):5093-100.
207. Nakamura K, Johnson GL. PB1 domains of MEKK2 and MEKK3 interact with the MEK5 PB1 domain for activation of the ERK5 pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(39):36989-92.
208. Nakamura K, Johnson GL. Noncanonical function of MEKK2 and MEK5 PB1 domains for coordinated extracellular signal-regulated kinase 5 and c-Jun N-terminal kinase signaling. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(12):4566-77.

209. Glatz G, Gogl G, Alexa A, Remenyi A. Structural mechanism for the specific assembly and activation of the extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) module. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(12):8596-609.
210. Takeda A-N, Oberoi-Khanuja TK, Glatz G, Schulenburg K, Scholz R-P, Carpy A, et al. Ubiquitin-dependent regulation of MEKK2/3-MEK5-ERK5 signaling module by XIAP and cIAP1. *The EMBO journal*. 2014;33(16):1784-801.
211. Ohkawara B, Shirakabe K, Hyodo-Miura J, Matsuo R, Ueno N, Matsumoto K, et al. Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF-beta-mediated mesoderm induction. *Genes & development*. 2004;18(4):381-6.
212. Smit L, Baas A, Kuipers J, Korswagen H, van de Wetering M, Clevers H. Wnt activates the Tak1/Nemo-like kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(17):17232-40.
213. Abe MK, Kuo W-L, Hershenson MB, Rosner MR. Extracellular Signal-Regulated Kinase 7 (ERK7), a Novel ERK with a C-Terminal Domain That Regulates Its Activity, Its Cellular Localization, and Cell Growth. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(2):1301-12.
214. Whinston E, Omerza G, Singh A, Tio CW, Winter E. Activation of the Smk1 mitogen-activated protein kinase by developmentally regulated autophosphorylation. *Molecular and cellular biology*. 2013;33(4):688-700.
215. Nagy SK, Darula Z, Kallai BM, Bogre L, Banhegyi G, Medzihradszky KF, et al. Activation of AtMPK9 through autophosphorylation that makes it independent of the canonical MAPK cascades. *The Biochemical journal*. 2015;467(1):167-75.
216. Cheng M, Zhen E, Robinson MJ, Ebert D, Goldsmith E, Cobb MH. Characterization of a protein kinase that phosphorylates serine 189 of the mitogen-activated protein kinase homolog ERK3. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(20):12057-62.
217. De la Mota-Peynado A, Chernoff J, Beeser A. Identification of the atypical MAPK Erk3 as a novel substrate for p21-activated kinase (Pak) activity. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(15):13603-11.
218. Deleris P, Trost M, Topisirovic I, Tanguay PL, Borden KL, Thibault P, et al. Activation loop phosphorylation of ERK3/ERK4 by group I p21-activated kinases (PAKs) defines a novel PAK-ERK3/4-MAPK-activated protein kinase 5 signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(8):6470-8.
219. Cho US, Xu W. Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature*. 2007;445(7123):53-7.
220. Eichhorn PJA, Creighton MP, Bernards R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2009;1795(1):1-15.
221. Gomez N, Tonks NK, Morrison C, Harmar T, Cohen P. Evidence for communication between nerve growth factor and protein tyrosine phosphorylation. *FEBS letters*. 1990;271(1-2):119-22.
222. Gomez N, Cohen P. Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature*. 1991;353(6340):170-3.
223. Prickett TD, Brautigan DL. Cytokine activation of p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis is opposed by alpha-4 targeting of protein phosphatase 2A for site-specific dephosphorylation of MEK3. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(12):4217-27.
224. Takekawa M, Maeda T, Saito H. Protein phosphatase 2C $\alpha$  inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *The EMBO journal*. 1998;17(16):4744-52.

225. Sundaresan P, Farndale RW. P38 mitogen-activated protein kinase dephosphorylation is regulated by protein phosphatase 2A in human platelets activated by collagen. *FEBS letters*. 2002;528(1-3):139-44.
226. Rossini GP, Pinna C, Malaguti C. Different sensitivities of p42 mitogen-activated protein kinase to phorbol ester and okadaic acid tumor promoters among cell types. *Biochem Pharmacol*. 1999;58(2):279-84.
227. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 2004;117(6):699-711.
228. Pulido R, Zúñiga A, Ullrich A. PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *The EMBO journal*. 1998;17(24):7337-50.
229. Buschbeck M, Eickhoff J, Sommer MN, Ullrich A. Phosphotyrosine-specific phosphatase PTP-SL regulates the ERK5 signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(33):29503-9.
230. McAlees JW, Sanders VM. Hematopoietic Protein Tyrosine Phosphatase Mediates  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor-Induced Regulation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in B Lymphocytes. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(3):675-86.
231. Nichols A, Camps M, Gillieron C, Chabert C, Brunet A, Wilsbacher J, et al. Substrate recognition domains within extracellular signal-regulated kinase mediate binding and catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-3. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(32):24613-21.
232. Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature cell biology*. 2000;2(2):110-6.
233. Tanoue T, Maeda R, Adachi M, Nishida E. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *The EMBO journal*. 2001;20(3):466-79.
234. Zhang YY, Wu JW, Wang ZX. A distinct interaction mode revealed by the crystal structure of the kinase p38 $\alpha$  with the MAPK binding domain of the phosphatase MKP5. *Science signaling*. 2011;4(204):ra88.
235. Kumar GS, Zettl H, Page R, Peti W. Structural basis for the regulation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase p38 $\alpha$  by the dual specificity phosphatase 16 MAP kinase binding domain in solution. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(39):28347-56.
236. Francis DM, Koveal D, Tortajada A, Page R, Peti W. Interaction of kinase-interaction-motif protein tyrosine phosphatases with the mitogen-activated protein kinase ERK2. *PloS one*. 2014;9(3):e91934.
237. Liu X, Zhang CS, Lu C, Lin SC, Wu JW, Wang ZX. A conserved motif in JNK/p38-specific MAPK phosphatases as a determinant for JNK1 recognition and inactivation. *Nature communications*. 2016;7:10879.
238. Camps M, Nichols A, Gillieron C, Antonsson B, Muda M, Chabert C, et al. Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science (New York, NY)*. 1998;280(5367):1262-5.
239. Mandl M, Slack DN, Keyse SM. Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(5):1830-45.
240. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase

- activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(13):7420-6.
241. Slack DN, Seternes OM, Gabrielsen M, Keyse SM. Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(19):16491-500.
  242. Zhang Q, Muller M, Chen CH, Zeng L, Farooq A, Zhou M-M. New Insights into the Catalytic Activation of the MAPK Phosphatase PAC-1 Induced by its Substrate MAPK ERK2 Binding. *Journal of Molecular Biology*. 2005;354(4):777-88.
  243. Chu Y, Solski PA, Khosravi-Far R, Der CJ, Kelly K. The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(11):6497-501.
  244. Chen P, Hutter D, Yang X, Gorospe M, Davis RJ, Liu Y. Discordance between the binding affinity of mitogen-activated protein kinase subfamily members for MAP kinase phosphatase-2 and their ability to activate the phosphatase catalytically. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(31):29440-9.
  245. Muda M, Theodosiou A, Rodrigues N, Boschert U, Camps M, Gillieron C, et al. The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(44):27205-8.
  246. Dowd S, Sneddon AA, Keyse SM. Isolation of the human genes encoding the pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases. *Journal of cell science*. 1998;111 ( Pt 22):3389-99.
  247. Muda M, Boschert U, Smith A, Antonsson B, Gillieron C, Chabert C, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(8):5141-51.
  248. Karlsson M, Mathers J, Dickinson RJ, Mandl M, Keyse SM. Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(40):41882-91.
  249. Finch AR, Caunt CJ, Perrett RM, Tsaneva-Atanasova K, McArdle CA. Dual specificity phosphatases 10 and 16 are positive regulators of EGF-stimulated ERK activity: indirect regulation of ERK signals by JNK/p38 selective MAPK phosphatases. *Cell Signal*. 2012;24(5):1002-11.
  250. Harding A, Tian T, Westbury E, Frische E, Hancock JF. Subcellular localization determines MAP kinase signal output. *Current Biology*. 2005;15(9):869-73.
  251. Lu G, Kang YJ, Han J, Herschman HR, Stefani E, Wang Y. TAB-1 modulates intracellular localization of p38 MAP kinase and downstream signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(9):6087-95.
  252. . !!! INVALID CITATION !!! (105, 152, 153).
  253. Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida K. A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(26):16657-62.



254. Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *The EMBO journal*. 1997;16(8):1901-8.
255. Chuderland D, Konson A, Seger R. Identification and Characterization of a General Nuclear Translocation Signal in Signaling Proteins. *Molecular cell*. 2008;31(6):850-61.
256. Plotnikov A, Chuderland D, Karamansha Y, Livnah O, Seger R. Nuclear extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 translocation is mediated by casein kinase 2 and accelerated by autophosphorylation. *Molecular and cellular biology*. 2011;31(17):3515-30.
257. Buschbeck M, Ullrich A. The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(4):2659-67.
258. Kondoh K, Terasawa K, Morimoto H, Nishida E. Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(5):1679-90.
259. Zehorai E, Seger R. Beta-Like Importins Mediate the Nuclear Translocation of Mitogen-Activated Protein Kinases. *Molecular and cellular biology*. 2014;34(2):259-70.
260. Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Current biology : CB*. 1998;8(19):1049-57.
261. Aredia F, Malatesta M, Veneroni P, Bottone MG. Analysis of ERK3 intracellular localization: dynamic distribution during mitosis and apoptosis. *European journal of histochemistry : EJH*. 2015;59(4):2571.
262. Amm I, Sommer T, Wolf DH. Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin–proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014;1843(1):182-96.
263. Etlinger JD, Goldberg AL. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(1):54-8.
264. Dochez AR. INTRACELLULAR PROTEOLYTIC ENZYMES OF LIVER. *The Journal of experimental medicine*. 1910;12(5):666-84.
265. Goldberg AL. Protein turnover in skeletal muscle. I. Protein catabolism during work-induced hypertrophy and growth induced with growth hormone. *The Journal of biological chemistry*. 1969;244(12):3217-22.
266. Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1978;81(4):1100-5.
267. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(4):1783-6.
268. Hershko A, Ciechanover A, Rose IA. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(7):3107-10.
269. Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1980;255(16):7529-32.

270. Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975;72(1):11-5.
271. Ciechanover A, Elias S, Heller H, Hershko A. "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257(5):2537-42.
272. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *The Journal of biological chemistry*. 1983;258(13):8206-14.
273. Hershko A, Leshinsky E, Ganoth D, Heller H. ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(6):1619-23.
274. Ciechanover A, Finley D, Varshavsky A. Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*. 1984;37(1):57-66.
275. Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A. Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*. 1984;37(1):43-55.
276. Varshavsky A. The Ubiquitin System, an Immense Realm. *Annual Review of Biochemistry*. 2012;81(1):167-76.
277. Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(1):9-20.
278. Yen HC, Xu Q, Chou DM, Zhao Z, Elledge SJ. Global protein stability profiling in mammalian cells. *Science (New York, NY)*. 2008;322(5903):918-23.
279. Yen HC, Elledge SJ. Identification of SCF ubiquitin ligase substrates by global protein stability profiling. *Science (New York, NY)*. 2008;322(5903):923-9.
280. Kim W, Bennett EJ, Huttlin EL, Guo A, Li J, Possemato A, et al. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin modified proteome. *Molecular cell*. 2011;44(2):325-40.
281. Emanuele MJ, Elia AE, Xu Q, Thoma CR, Izhar L, Leng Y, et al. Global identification of modular cullin-RING ligase substrates. *Cell*. 2011;147(2):459-74.
282. Xu G, Paige JS, Jaffrey SR. Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nature biotechnology*. 2010;28(8):868-73.
283. Eden E, Geva-Zatorsky N, Issaeva I, Cohen A, Dekel E, Danon T, et al. Proteome Half-Life Dynamics in Living Human Cells. *Science (New York, NY)*. 2011;331(6018):764-8.
284. Schwanhaussier B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2011;473(7347):337-42.
285. Sandoval PC, Slentz DH, Pisitkun T, Saeed F, Hoffert JD, Knepper MA. Proteome-wide measurement of protein half-lives and translation rates in vasopressin-sensitive collecting duct cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(11):1793-805.
286. Helbig AO, Daran-Lapujade P, van Maris AJ, de Hulster EA, de Ridder D, Pronk JT, et al. The diversity of protein turnover and abundance under nitrogen-limited steady-state conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular bioSystems*. 2011;7(12):3316-26.
287. Christiano R, Nagaraj N, Frohlich F, Walther TC. Global proteome turnover analyses of the Yeasts *S. cerevisiae* and *S. pombe*. *Cell reports*. 2014;9(5):1959-65.
288. Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL, Welch WJ. Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature*. 1988;331(6152):192-4.

289. Dahlmann B, Kuehn L, Rutschmann M, Reinauer H. Purification and characterization of a multicatalytic high-molecular-mass proteinase from rat skeletal muscle. *Biochemical Journal*. 1985;228(1):161-70.
290. Kopp F, Steiner R, Dahlmann B, Kuehn L, Reinauer H. Size and shape of the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle. *Biochimica et biophysica acta*. 1986;872(3):253-60.
291. Missiakas D, Schwager F, Betton JM, Georgopoulos C, Raina S. Identification and characterization of HsIV HsIU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *The EMBO journal*. 1996;15(24):6899-909.
292. Rohrwild M, Coux O, Huang HC, Moerschell RP, Yoo SJ, Seol JH, et al. HsIV-HsIU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(12):5808-13.
293. Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(10):7709-18.
294. Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(2):104-15.
295. Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, et al. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*. 1997;386(6624):463-71.
296. Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, Yasuoka N, et al. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure (London, England : 1993)*. 2002;10(5):609-18.
297. Cardozo C, Kohanski RA. Altered Properties of the Branched Chain Amino Acid-preferring Activity Contribute to Increased Cleavages after Branched Chain Residues by the "Immunoproteasome". *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(27):16764-70.
298. Gaczynska M, Rock KL, Spies T, Goldberg AL. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(20):9213-7.
299. Smith DM, Chang SC, Park S, Finley D, Cheng Y, Goldberg AL. Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Molecular cell*. 2007;27(5):731-44.
300. Rabl J, Smith DM, Yu Y, Chang SC, Goldberg AL, Cheng Y. Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Molecular cell*. 2008;30(3):360-8.
301. Whitby FG, Masters EI, Kramer L, Knowlton JR, Yao Y, Wang CC, et al. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature*. 2000;408(6808):115-20.
302. Sadre-Bazzaz K, Whitby FG, Robinson H, Formosa T, Hill CP. Structure of a Bim10 complex reveals common mechanisms for proteasome binding and gate opening. *Molecular cell*. 2010;37(5):728-35.
303. Groettrup M, Soza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, et al. A role for the proteasome regulator PA28[alpha] in antigen presentation. *Nature*. 1996;381(6578):166-8.
304. Lasker K, Forster F, Bohn S, Walzthoeni T, Villa E, Unverdorben P, et al. Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109(5):1380-7.

305. Beck F, Unverdorben P, Bohn S, Schweitzer A, Pfeifer G, Sakata E, et al. Near-atomic resolution structural model of the yeast 26S proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(37):14870-5.

306. Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature*. 2012;482(7384):186-91.

307. Da Fonseca P, He J, Morris EP. Molecular Model of the Human 26S Proteasome. *Molecular cell*. 2012;46(1):54-66.

308. Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, et al. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*. 1998;94(5):615-23.

309. Tomko RJ, Jr., Funakoshi M, Schneider K, Wang J, Hochstrasser M. Heterohexameric ring arrangement of the eukaryotic proteasomal ATPases: implications for proteasome structure and assembly. *Molecular cell*. 2010;38(3):393-403.

310. Kish-Trier E, Hill CP. Structural Biology of the Proteasome. *Annual review of biophysics*. 2013;42:29-49.

311. Finley D. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annual Review of Biochemistry*. 2009;78(1):477-513.

312. Josse L, Harley ME, Pires IM, Hughes DA. Fission yeast Dss1 associates with the proteasome and is required for efficient ubiquitin-dependent proteolysis. *The Biochemical journal*. 2006;393(Pt 1):303-9.

313. Paraskevopoulos K, Kriegenburg F, Tatham MH, Rösner HI, Medina B, Larsen IB, et al. Dss1 is a 26S proteasome ubiquitin receptor. *Molecular cell*. 2014;56(3):453-61.

314. Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, Chen X, Randles L, Shi Y, et al. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature*. 2008;453(7194):481-8.

315. Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(10):7059-61.

316. Shi Y, Chen X, Elsasser S, Stocks BB, Tian G, Lee BH, et al. Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome. *Science (New York, NY)*. 2016;351(6275).

317. Elsasser S, Chandler-Militello D, Muller B, Hanna J, Finley D. Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(26):26817-22.

318. Smith DM, Kafri G, Cheng Y, Ng D, Walz T, Goldberg AL. ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Molecular cell*. 2005;20(5):687-98.

319. Benaroudj N, Zwickl P, Seemuller E, Baumeister W, Goldberg AL. ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation. *Molecular cell*. 2003;11(1):69-78.

320. Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR, Koonin EV, et al. <div xmlns="http://www.w3.org/1999/xhtml">Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26<em>S</em> Proteasome</div>. *Science (New York, NY)*. 2002;298(5593):611-5.

321. Yao T, Song L, Xu W, DeMartino GN, Florens L, Swanson SK, et al. Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1. *Nature cell biology*. 2006;8(9):994-1002.
322. Leggett DS, Hanna J, Borodovsky A, Crosas B, Schmidt M, Baker RT, et al. Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Molecular cell*. 2002;10(3):495-507.
323. Sakata E, Bohn S, Mihalache O, Kiss P, Beck F, Nagy I, et al. Localization of the proteasomal ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 by electron cryomicroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(5):1479-84.
324. Wehmer M, Sakata E. Recent advances in the structural biology of the 26S proteasome. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016;79:437-42.
325. Ghaboosi N, Deshaies RJ. A conditional yeast E1 mutant blocks the ubiquitin-proteasome pathway and reveals a role for ubiquitin conjugates in targeting Rad23 to the proteasome. *Mol Biol Cell*. 2007;18(5):1953-63.
326. Lee TV, Ding T, Chen Z, Rajendran V, Scherr H, Lackey M, et al. The E1 ubiquitin-activating enzyme Uba1 in *Drosophila* controls apoptosis autonomously and tissue growth non-autonomously. *Development (Cambridge, England)*. 2008;135(1):43-52.
327. McGrath JP, Jentsch S, Varshavsky A. UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *The EMBO journal*. 1991;10(1):227-36.
328. Hochstrasser M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*. 2009;458(7237):422-9.
329. Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, et al. Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nature cell biology*. 2008;10(5):547-55.
330. Tatham MH, Geoffroy MC, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray EG, et al. RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nature cell biology*. 2008;10(5):538-46.
331. Alfano C, Faggiano S, Pastore A. The Ball and Chain of Polyubiquitin Structures. *Trends in Biochemical Sciences*. 2016;41(4):371-85.
332. Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, et al. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science (New York, NY)*. 1989;243(4898):1576-83.
333. Messick TE, Greenberg RA. The ubiquitin landscape at DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology*. 2009;187(3):319-26.
334. Erpapazoglou Z, Walker O, Haguenuer-Tsapis R. Versatile Roles of K63-Linked Ubiquitin Chains in Trafficking. *Cells*. 2014;3(4):1027-88.
335. Morris JR, Solomon E. BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Human Molecular Genetics*. 2004;13(8):807-17.
336. Gatti M, Pinato S, Maiolica A, Rocchio F, Prato MG, Aebersold R, et al. RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage. *Cell reports*. 2015;10(2):226-38.
337. Huang H, Jeon MS, Liao L, Yang C, Elly C, Yates JR, 3rd, et al. K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity*. 2010;33(1):60-70.

338. Fei C, Li Z, Li C, Chen Y, Chen Z, He X, et al. Smurf1-Mediated Lys29-Linked Nonproteolytic Polyubiquitination of Axin Negatively Regulates Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *Molecular and cellular biology*. 2013;33(20):4095-105.
339. Gerlach B, Cordier SM, Schmukle AC, Emmerich CH, Rieser E, Haas TL, et al. Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature*. 2011;471(7340):591-6.
340. Ikeda F, Deribe YL, Skanland SS, Stieglitz B, Grabbe C, Franz-Wachtel M, et al. SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF-kappaB activity and apoptosis. *Nature*. 2011;471(7340):637-41.
341. Meyer HJ, Rape M. Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell*. 2014;157(4):910-21.
342. Grice GL, Lobb IT, Weekes MP, Gygi SP, Antrobus R, Nathan JA. The Proteasome Distinguishes between Heterotypic and Homotypic lysine-11-Linked Polyubiquitin Chains. *Cell reports*. 2015;12(4):545-53.
343. Breitschopf K, Bengali E, Ziv T, Admon A, Ciechanover A. A novel site for ubiquitination: The N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO Journal*. 1998;17(20):5964-73.
344. Bloom J, Amador V, Bartolini F, DeMartino G, Pagano M. Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. *Cell*. 2003;115(1):71-82.
345. Reinstein E, Scheffner M, Oren M, Ciechanover A, Schwartz A. Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene*. 2000;19(51):5944-50.
346. Aviel S, Winberg G, Massucci M, Ciechanover A. Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway: Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(31):23491-9.
347. Fajerman I, Schwartz AL, Ciechanover A. Degradation of the Id2 developmental regulator: Targeting via N-terminal ubiquitination. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;314(2):505-12.
348. Ikeda M, Ikeda A, Longnecker R. lysine-independent ubiquitination of Epstein-Barr virus LMP2A. *Virology*. 2002;300(1):153-9.
349. Tatham MH, Plechanovova A, Jaffray EG, Salmen H, Hay RT. Ube2W conjugates ubiquitin to alpha-amino groups of protein N-termini. *The Biochemical journal*. 2013;453(1):137-45.
350. Scaglione KM, Basrur V, Ashraf NS, Konen JR, Elenitoba-Johnson KS, Todi SV, et al. The ubiquitin-conjugating enzyme (E2) Ube2w ubiquitinates the N terminus of substrates. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(26):18784-8.
351. Vittal V, Shi L, Wenzel DM, Scaglione KM, Duncan ED, Basrur V, et al. Intrinsic disorder drives N-terminal ubiquitination by Ube2w. *Nature chemical biology*. 2015;11(1):83-9.
352. Ben-Saadon R, Fajerman I, Ziv T, Hellman U, Schwartz AL, Ciechanover A. The Tumor Suppressor Protein p16INK4a and the Human Papillomavirus Oncoprotein-58 E7 Are Naturally Occurring lysine-less Proteins That Are Degraded by the Ubiquitin System: DIRECT EVIDENCE FOR UBIQUITINATION AT THE N-TERMINAL RESIDUE. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(40):41414-21.

353. Coulombe P, Rodier G, Bonneil E, Thibault P, Meloche S. N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(14):6140-50.
354. Wu PY, Hanlon M, Eddins M, Tsui C, Rogers RS, Jensen JP, et al. A conserved catalytic residue in the ubiquitin-conjugating enzyme family. *The EMBO journal*. 2003;22(19):5241-50.
355. Christensen DE, Brzovic PS, Klevit RE. E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. *Nature structural & molecular biology*. 2007;14(10):941-8.
356. Maure JF, Moser SC, Jaffray EG, A FA, Hay RT. Loss of ubiquitin E2 Ube2w rescues hypersensitivity of Rnf4 mutant cells to DNA damage. *Scientific reports*. 2016;6:26178.
357. Wang B, Merillat SA, Vincent M, Huber AK, Basrur V, Mangelberger D, et al. Loss of the Ubiquitin-conjugating Enzyme UBE2W Results in Susceptibility to Early Postnatal Lethality and Defects in Skin, Immune, and Male Reproductive Systems. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(6):3030-42.
358. Swanson R, Hochstrasser M. A viable ubiquitin-activating enzyme mutant for evaluating ubiquitin system function in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*. 2000;477(3):193-8.
359. Lee I, Schindelin H. Structural Insights into E1-Catalyzed Ubiquitin Activation and Transfer to Conjugating Enzymes. *Cell*. 2008;134(2):268-78.
360. Olsen Shaun K, Lima Christopher D. Structure of a Ubiquitin E1-E2 Complex: Insights to E1-E2 Thioester Transfer. *Molecular cell*. 2013;49(5):884-96.
361. Jin J, Li X, Gygi SP, Harper JW. Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature*. 2007;447(7148):1135-8.
362. Chiu YH, Sun Q, Chen ZJ. E1-L2 Activates Both Ubiquitin and FAT10. *Molecular cell*. 2007;27(6):1014-23.
363. Lee PC, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Alternative ubiquitin activation/conjugation cascades interact with N-end rule ubiquitin ligases to control degradation of RGS proteins. *Molecular cell*. 2011;43(3):392-405.
364. Lee PC, Dodart JC, Aron L, Finley LW, Bronson RT, Haigis MC, et al. Altered social behavior and neuronal development in mice lacking the Uba6-Use1 ubiquitin transfer system. *Molecular cell*. 2013;50(2):172-84.
365. Wang X, Herr RA, Hansen TH. Ubiquitination of substrates by esterification. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2012;13(1):19-24.
366. McGinty RK, Henrici RC, Tan S. Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. *Nature*. 2014;514(7524):591-6.
367. David Y, Ziv T, Admon A, Navon A. The E2 ubiquitin-conjugating enzymes direct polyubiquitination to preferred lysines. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(12):8595-604.
368. Haldeman MT, Xia G, Kasperek EM, Pickart CM. Structure and function of ubiquitin conjugating enzyme E2-25K: the tail is a core-dependent activity element. *Biochemistry*. 1997;36(34):10526-37.
369. Ryu KS, Choi YS, Ko J, Kim SO, Kim HJ, Cheong HK, et al. Direct characterization of E2-dependent target specificity and processivity using an artificial p27-linker-E2 ubiquitination system. *BMB reports*. 2008;41(12):852-7.

370. Hofmann RM, Pickart CM. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*. 1999;96(5):645-53.
371. Eddins MJ, Carlile CM, Gomez KM, Pickart CM, Wolberger C. Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(10):915-20.
372. Wu T, Merbl Y, Huo Y, Gallop JL, Tzur A, Kirschner MW. UBE2S drives elongation of K11-linked ubiquitin chains by the anaphase-promoting complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(4):1355-60.
373. Eletr ZM, Huang DT, Duda DM, Schulman BA, Kuhlman B. E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer. *Nature structural & molecular biology*. 2005;12(10):933-4.
374. Zheng N, Wang P, Jeffrey PD, Pavletich NP. Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell*. 2000;102(4):533-9.
375. Schumacher FR, Wilson G, Day CL. The N-terminal extension of UBE2E ubiquitin-conjugating enzymes limits chain assembly. *J Mol Biol*. 2013;425(22):4099-111.
376. Stewart MD, Ritterhoff T, Klevit RE, Brzovic PS. E2 enzymes: more than just middle men. *Cell Research*. 2016;26(4):423-40.
377. Brzovic PS, Lissounov A, Christensen DE, Hoyt DW, Klevit RE. A UbcH5/ubiquitin noncovalent complex is required for processive BRCA1-directed ubiquitination. *Molecular cell*. 2006;21(6):873-80.
378. Buetow L, Gabrielsen M, Anthony NG, Dou H, Patel A, Aitkenhead H, et al. Activation of a primed RING E3-E2-ubiquitin complex by non-covalent ubiquitin. *Molecular cell*. 2015;58(2):297-310.
379. Hibbert RG, Huang A, Boelens R, Sixma TK. E3 ligase Rad18 promotes monoubiquitination rather than ubiquitin chain formation by E2 enzyme Rad6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(14):5590-5.
380. Knipscheer P, van Dijk WJ, Olsen JV, Mann M, Sixma TK. Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *The EMBO journal*. 2007;26(11):2797-807.
381. Nguyen L, Plafker KS, Starnes A, Cook M, Klevit RE, Plafker SM. The ubiquitin-conjugating enzyme, UbcM2, is restricted to monoubiquitylation by a two-fold mechanism that involves backside residues of E2 and Lys48 of ubiquitin. *Biochemistry*. 2014;53(24):4004-14.
382. Kumar P, Magala P, Geiger-Schuller KR, Majumdar A, Tolman JR, Wolberger C. Role of a non-canonical surface of Rad6 in ubiquitin conjugating activity. *Nucleic acids research*. 2015;43(18):9039-50.
383. Das R, Mariano J, Tsai YC, Kalathur RC, Kostova Z, Li J, et al. Allosteric activation of E2-RING finger-mediated ubiquitylation by a structurally defined specific E2-binding region of gp78. *Molecular cell*. 2009;34(6):674-85.
384. Das R, Liang YH, Mariano J, Li J, Huang T, King A, et al. Allosteric regulation of E2:E3 interactions promote a processive ubiquitination machine. *The EMBO journal*. 2013;32(18):2504-16.
385. Kleiger G, Saha A, Lewis S, Kuhlman B, Deshaies RJ. Rapid E2-E3 assembly and disassembly enable processive ubiquitylation of cullin-RING ubiquitin ligase substrates. *Cell*. 2009;139(5):957-68.



386. Machida YJ, Machida Y, Chen Y, Gurtan AM, Kupfer GM, D'Andrea AD, et al. UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Molecular cell*. 2006;23(4):589-96.
387. Ravid T, Hochstrasser M. Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue. *Nature cell biology*. 2007;9(4):422-7.
388. Li W, Tu D, Brunger AT, Ye Y. A ubiquitin ligase transfers preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate. *Nature*. 2007;446(7133):333-7.
389. Semplici F, Meggio F, Pinna LA, Oliviero S. CK2-dependent phosphorylation of the E2 ubiquitin conjugating enzyme UBC3B induces its interaction with beta-TrCP and enhances beta-catenin degradation. *Oncogene*. 2002;21(25):3978-87.
390. Sarcevic B, Mawson A, Baker RT, Sutherland RL. Regulation of the ubiquitin-conjugating enzyme hHR6A by CDK-mediated phosphorylation. *The EMBO journal*. 2002;21(8):2009-18.
391. Valimberti I, Tiberti M, Lambrugh M, Sarcevic B, Papaleo E. E2 superfamily of ubiquitin-conjugating enzymes: constitutively active or activated through phosphorylation in the catalytic cleft. *Scientific reports*. 2015;5:14849.
392. Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(7):2563-7.
393. Schwarz SE, Rosa JL, Scheffner M. Characterization of human hect domain family members and their interaction with UbcH5 and UbcH7. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(20):12148-54.
394. Kamadurai HB, Souphron J, Scott DC, Duda DM, Miller DJ, Stringer D, et al. Insights into Ubiquitin Transfer Cascades from a Structure of a UbcH5B~Ubiquitin-HECTNEDD4L Complex. *Molecular cell*. 2009;36(6):1095-102.
395. Sheng Y, Hong JH, Doherty R, Srikumar T, Shloush J, Avvakumov GV, et al. A Human Ubiquitin Conjugating Enzyme (E2)-HECT E3 Ligase Structure-function Screen. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(8):329-41.
396. Sheng Y, Hong JH, Doherty R, Srikumar T, Shloush J, Avvakumov GV, et al. A human ubiquitin conjugating enzyme (E2)-HECT E3 ligase structure-function screen. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2012;11(8):329-41.
397. Kar G, Keskin O, Nussinov R, Gursoy A. Human proteome-scale structural modeling of E2-E3 interactions exploiting interface motifs. *Journal of Proteome Research*. 2012;11(2):1196-207.
398. Wang M, Pickart CM. Different HECT domain ubiquitin ligases employ distinct mechanisms of polyubiquitin chain synthesis. *The EMBO journal*. 2005;24(24):4324-33.
399. Kim HC, Huibregtse JM. Polyubiquitination by HECT E3s and the Determinants of Chain Type Specificity. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(12):3307-18.
400. Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, et al. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PloS one*. 2008;3(1):e1487.
401. Ohi MD, Vander Kooi CW, Rosenberg JA, Chazin WJ, Gould KL. Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nature structural biology*. 2003;10(4):250-5.

402. Janjusevic R, Abramovitch RB, Martin GB, Stebbins CE. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science (New York, NY)*. 2006;311(5758):222-6.
403. Wu B, Skarina T, Yee A, Jobin MC, Dileo R, Semesi A, et al. NleG Type 3 effectors from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* are U-Box E3 ubiquitin ligases. *PLoS pathogens*. 2010;6(6):e1000960.
404. Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(20):11364-9.
405. Christensen DE, Klevit RE. Dynamic interactions of proteins in complex networks: identifying the complete set of interacting E2s for functional investigation of E3-dependent protein ubiquitination. *The FEBS journal*. 2009;276(19):5381-9.
406. van Wijk SJL, de Vries SJ, Kemmeren P, Huang A, Boelens R, Bonvin AMJJ, et al. A comprehensive framework of E2–RING E3 interactions of the human ubiquitin–proteasome system. *Molecular systems biology*. 2009;5:295-.
407. Markson G, Kiel C, Hyde R, Brown S, Charalabous P, Bremm A, et al. Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network. *Genome Research*. 2009;19(10):1905-11.
408. DiBello A, Datta AB, Zhang X, Wolberger C. Role of E2-RING Interactions in Governing RNF4-Mediated Substrate Ubiquitination. *J Mol Biol*. 2016;428(23):4639-50.
409. Kamura T, Koepp DM, Conrad MN, Skowyra D, Moreland RJ, Iliopoulos O, et al. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science (New York, NY)*. 1999;284(5414):657-61.
410. Seol JH, Feldman RM, Zachariae W, Shevchenko A, Correll CC, Lyapina S, et al. Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes & development*. 1999;13(12):1614-26.
411. Lammer D, Mathias N, Laplaza JM, Jiang W, Liu Y, Callis J, et al. Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes & development*. 1998;12(7):914-26.
412. Duda DM, Borg LA, Scott DC, Hunt HW, Hammel M, Schulman BA. Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation. *Cell*. 2008;134(6):995-1006.
413. Saha A, Deshaies RJ. Multimodal activation of the ubiquitin ligase SCF by Nedd8 conjugation. *Molecular cell*. 2008;32(1):21-31.
414. Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature*. 2009;458(7239):732-6.
415. Speirs AL. THALIDOMIDE AND CONGENITAL ABNORMALITIES. *The Lancet*. 1962;279(7224):303-5.
416. Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science (New York, NY)*. 2010;327(5971):1345-50.
417. Fischer ES, Böhm K, Lydeard JR, Yang H, Stadler MB, Cavadini S, et al. Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide. *Nature*. 2014;512(7512):49-53.

418. Wenzel DM, Lissounov A, Brzovic PS, Klevit RE. UBCH7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature*. 2011;474(7349):105-8.
419. Stieglitz B, Morris-Davies AC, Koliopoulos MG, Christodoulou E, Rittinger K. LUBAC synthesizes linear ubiquitin chains via a thioester intermediate. *EMBO reports*. 2012;13(9):840-6.
420. Smit JJ, Monteferrario D, Noordermeer SM, van Dijk WJ, van der Reijden BA, Sixma TK. The E3 ligase HOIP specifies linear ubiquitin chain assembly through its RING-IBR-RING domain and the unique LDD extension. *The EMBO journal*. 2012;31(19):3833-44.
421. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998;392(6676):605-8.
422. Riley BE, Loughheed JC, Callaway K, Velasquez M, Brecht E, Nguyen L, et al. Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nature communications*. 2013;4:1982.
423. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology*. 2008;183(5):795-803.
424. Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V, Sowa ME, Huttlin EL, Gygi SP, et al. Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature*. 2013;496(7445):372-6.
425. Chaugule VK, Burchell L, Barber KR, Sidhu A, Leslie SJ, Shaw GS, et al. Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *The EMBO journal*. 2011;30(14):2853-67.
426. Trempe JF, Sauve V, Grenier K, Seirafi M, Tang MY, Menade M, et al. Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science (New York, NY)*. 2013;340(6139):1451-5.
427. Bett John S, Ritorto Maria S, Ewan R, Jaffray Ellis G, Virdee S, Chin Jason W, et al. Ubiquitin C-terminal hydrolases cleave isopeptide- and peptide-linked ubiquitin from structured proteins but do not edit ubiquitin homopolymers. *Biochemical Journal*. 2015;466(Pt 3):489-98.
428. Johnston SC, Riddle SM, Cohen RE, Hill CP. Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases. *The EMBO journal*. 1999;18(14):3877-87.
429. Hu M, Li P, Song L, Jeffrey PD, Chenova TA, Wilkinson KD, et al. Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *The EMBO journal*. 2005;24(21):3747-56.
430. Komander D, Lord CJ, Scheel H, Swift S, Hofmann K, Ashworth A, et al. The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module. *Molecular cell*. 2008;29(4):451-64.
431. Ahmed N, Zeng M, Sinha I, Polin L, Wei WZ, Rathinam C, et al. The E3 ligase Itch and deubiquitinase Cyld act together to regulate Tak1 and inflammation. *Nat Immunol*. 2011;12(12):1176-83.
432. Komander D, Reyes-Turcu F, Licchesi JDF, Odenwaelder P, Wilkinson KD, Barford D. Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO reports*. 2009;10(5):466-73.

433. Mevissen Tycho ET, Hospenthal Manuela K, Geurink Paul P, Elliott Paul R, Akutsu M, Arnaudo N, et al. OTU Deubiquitinases Reveal Mechanisms of Linkage Specificity and Enable Ubiquitin Chain Restriction Analysis. *Cell*. 2013;154(1):169-84.
434. McGouran Joanna F, Gaertner Selina R, Altun M, Kramer Holger B, Kessler Benedikt M. Deubiquitinating Enzyme Specificity for Ubiquitin Chain Topology Profiled by Di-Ubiquitin Activity Probes. *Chemistry & Biology*. 2013;20(12):1447-55.
435. Komander D, Clague MJ, Urbe S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(8):550-63.
436. Shanmugam I, Abbas M, Ayoub F, Mirabal S, Bsaili M, Caulder EK, et al. Ubiquitin-specific Peptidase 20 Regulates Rad17 Stability, Checkpoint Kinase 1 Phosphorylation and DNA Repair by Homologous Recombination. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(33):22739-48.
437. Li Z, Wang D, Messing EM, Wu G. VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1 $\alpha$ . *EMBO reports*. 2005;6(4):373-8.
438. Shenoy SK, Modi AS, Shukla AK, Xiao K, Berthouze M, Ahn S, et al.  $\beta$ -Arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(16):6650-5.
439. Crosas B, Hanna J, Kirkpatrick DS, Zhang DP, Tone Y, Hathaway NA, et al. Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities. *Cell*. 2006;127(7):1401-13.
440. Schulte TW, Blagosklonny MV, Ingui C, Neckers L. Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(41):24585-8.
441. Grbovic OM, Basso AD, Sawai A, Ye Q, Friedlander P, Solit D, et al. V600E B-Raf requires the Hsp90 chaperone for stability and is degraded in response to Hsp90 inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(1):57-62.
442. Soga S, Kozawa T, Narumi H, Akinaga S, Irie K, Matsumoto K, et al. Radicicol leads to selective depletion of Raf kinase and disrupts K-Ras-activated aberrant signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(2):822-8.
443. Schulte TW, An WG, Neckers LM. Geldanamycin-induced destabilization of Raf-1 involves the proteasome. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;239(3):655-9.
444. Mitra S, Ghosh B, Gayen N, Roy J, Mandal AK. Bipartite Role of Hsp90 Keeps CRAF Kinase Poised for Activation. *The Journal of biological chemistry*. 2016.
445. Noble C, Mercer K, Hussain J, Carragher L, Giblett S, Hayward R, et al. CRAF autophosphorylation of serine 621 is required to prevent its proteasome-mediated degradation. *Molecular cell*. 2008;31(6):862-72.
446. da Rocha Dias S, Friedlos F, Light Y, Springer C, Workman P, Marais R. Activated B-Raf is an Hsp90 client protein that is targeted by the anticancer drug 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res*. 2005;65(23):10686-91.
447. Shen CH, Yuan P, Perez-Lorenzo R, Zhang Y, Lee SX, Ou Y, et al. Phosphorylation of BRAF by AMPK impairs BRAF-KSR1 association and cell proliferation. *Molecular cell*. 2013;52(2):161-72.

448. Samant RS, Clarke PA, Workman P. E3 ubiquitin ligase Cullin-5 modulates multiple molecular and cellular responses to heat shock protein 90 inhibition in human cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(18):6834-9.
449. Boczek EE, Reefschlager LG, Dehling M, Struller TJ, Hausler E, Seidl A, et al. Conformational processing of oncogenic v-Src kinase by the molecular chaperone Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(25):E3189-98.
450. Peng Y, Chen L, Li C, Lu W, Chen J. Inhibition of MDM2 by hsp90 contributes to mutant p53 stabilization. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(44):40583-90.
451. Bauer S, Yu LK, Demetri GD, Fletcher JA. Heat shock protein 90 inhibition in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Res*. 2006;66(18):9153-61.
452. Hong S-W, Jin D-H, Shin J-S, Moon J-H, Na Y-S, Jung K-A, et al. Ring Finger Protein 149 Is an E3 Ubiquitin Ligase Active on Wild-type v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1 (BRAF). *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(28):24017-25.
453. de la Cova C, Greenwald I. SEL-10/Fbw7-dependent negative feedback regulation of LIN-45/Braf signaling in *C. elegans* via a conserved phosphodegron. *Genes & development*. 2012;26(22):2524-35.
454. Hernandez MA, Patel B, Hey F, Giblett S, Davis H, Pritchard C. Regulation of BRAF protein stability by a negative feedback loop involving the MEK–ERK pathway but not the FBXW7 tumour suppressor. *Cellular Signalling*. 2016;28(6):561-71.
455. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
456. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*. 2010;363(9):809-19.
457. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *The New England journal of medicine*. 2014;371(20):1877-88.
458. Wood K, Luke JJ. Optimal Use of BRAF Targeting Therapy in the Immunotherapy Era. *Current oncology reports*. 2016;18(11):67.
459. Preusser M, Bienkowski M, Birner P. BRAF inhibitors in BRAF-V600 mutated primary neuroepithelial brain tumors. *Expert opinion on investigational drugs*. 2016;25(1):7-14.
460. Gong J, Cho M, Fakih M. RAS and BRAF in metastatic colorectal cancer management. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2016;7(5):687-704.
461. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine*. 2011;364(26):2507-16.
462. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *The New England journal of medicine*. 2012;367(2):107-14.
463. Fiskus W, Mitsiades N. B-Raf Inhibition in the Clinic: Present and Future. *Annual review of medicine*. 2016;67:29-43.
464. Tatokoro M, Koga F, Yoshida S, Kihara K. Heat shock protein 90 targeting therapy: state of the art and future perspective. *EXCLI journal*. 2015;14:48-58.

465. Smyth T, Paraiso KH, Hearn K, Rodriguez-Lopez AM, Munck JM, Haarberg HE, et al. Inhibition of HSP90 by AT13387 delays the emergence of resistance to BRAF inhibitors and overcomes resistance to dual BRAF and MEK inhibition in melanoma models. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(12):2793-804.
466. Acquaviva J, Smith DL, Jimenez JP, Zhang C, Sequeira M, He S, et al. Overcoming acquired BRAF inhibitor resistance in melanoma via targeted inhibition of Hsp90 with ganetespib. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(2):353-63.
467. Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, et al. TNF- $\alpha$  induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell*. 2000;103(7):1071-83.
468. Salmeron A, Ahmad TB, Carlile GW, Pappin D, Narsimhan RP, Ley SC. Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase. *The EMBO journal*. 1996;15(4):817-26.
469. Beinke S, Deka J, Lang V, Belich MP, Walker PA, Howell S, et al. NF-kappaB1 p105 negatively regulates TPL-2 MEK kinase activity. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(14):4739-52.
470. Belich MP, Salmeron A, Johnston LH, Ley SC. TPL-2 kinase regulates the proteolysis of the NF-kappaB-inhibitory protein NF-kappaB1 p105. *Nature*. 1999;397(6717):363-8.
471. Lang V, Symons A, Watton SJ, Janzen J, Soneji Y, Beinke S, et al. ABIN-2 forms a ternary complex with TPL-2 and NF-kappa B1 p105 and is essential for TPL-2 protein stability. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(12):5235-48.
472. Papoutsopoulou S, Symons A, Tharmalingham T, Belich MP, Kaiser F, Kioussis D, et al. ABIN-2 is required for optimal activation of Erk MAP kinase in innate immune responses. *Nat Immunol*. 2006;7(6):606-15.
473. Waterfield MR, Zhang M, Norman LP, Sun S-C. NF- $\kappa$ B1/p105 Regulates Lipopolysaccharide-Stimulated MAP Kinase Signaling by Governing the Stability and Function of the Tpl2 Kinase. *Molecular cell*. 2003;11(3):685-94.
474. Roget K, Ben-Addi A, Mambole-Dema A, Gantke T, Yang H-T, Janzen J, et al. I $\kappa$ B Kinase 2 Regulates TPL-2 Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 by Direct Phosphorylation of TPL-2 Serine 400. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(22):4684-90.
475. Nishizawa M, Okazaki K, Furuno N, Watanabe N, Sagata N. The 'second-codon rule' and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *The EMBO journal*. 1992;11(7):2433-46.
476. Nishizawa M, Furuno N, Okazaki K, Tanaka H, Ogawa Y, Sagata N. Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of *Xenopus* eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos. *The EMBO journal*. 1993;12(10):4021-7.
477. Watanabe N, Hunt T, Ikawa Y, Sagata N. Independent inactivation of MPF and cytostatic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 1991;352(6332):247-8.
478. Haccard O, Sarcevic B, Lewellyn A, Hartley R, Roy L, Izumi T, et al. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science (New York, NY)*. 1993;262(5137):1262-5.
479. Colledge WH, Carlton MB, Udy GB, Evans MJ. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*. 1994;370(6484):65-8.

480. Castro A, Peter M, Magnaghi-Jaulin L, Vigneron S, Galas S, Lorca T, et al. Cyclin B/cdc2 induces c-Mos stability by direct phosphorylation in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell*. 2001;12(9):2660-71.
481. Gonda DK, Bachmair A, Wunning I, Tobias JW, Lane WS, Varshavsky A. Universality and structure of the N-end rule. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(28):16700-12.
482. Bachmair A, Varshavsky A. The degradation signal in a short-lived protein. *Cell*. 1989;56(6):1019-32.
483. Sheng J, Kumagai A, Dunphy WG, Varshavsky A. Dissection of c-MOS degron. *The EMBO journal*. 2002;21(22):6061-71.
484. Esch RK, Errede B. Pheromone induction promotes Ste11 degradation through a MAPK feedback and ubiquitin-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(14):9160-5.
485. Wang Y, Dohlman HG. Pheromone-dependent ubiquitination of the mitogen-activated protein kinase kinase Ste7. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(18):15766-72.
486. Wang Y, Ge Q, Houston D, Thorner J, Errede B, Dohlman HG. Regulation of Ste7 ubiquitination by Ste11 phosphorylation and the Skp1-Cullin-F-box complex. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(25):22284-9.
487. Hurst JH, Dohlman HG. Dynamic ubiquitination of the mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) Ste7 determines mitogen-activated protein kinase (MAPK) specificity. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(26):18660-71.
488. Lu Z, Xu S, Joazeiro C, Cobb MH, Hunter T. The PHD Domain of MEKK1 Acts as an E3 Ubiquitin Ligase and Mediates Ubiquitination and Degradation of ERK1/2. *Molecular cell*. 2002;9(5):945-56.
489. Maruyama T, Kadowaki H, Okamoto N, Nagai A, Naguro I, Matsuzawa A, et al. CHIP-dependent termination of MEKK2 regulates temporal ERK activation required for proper hyperosmotic response. *The EMBO journal*. 2010;29(15):2501-14.
490. Charlaftis N, Suddason T, Wu X, Anwar S, Karin M, Gallagher E. The MEKK1 PHD ubiquitinates TAB1 to activate MAPKs in response to cytokines. *The EMBO journal*. 2014;33(21):2581-96.
491. Ashton-Beaucage D, Udell CM, Gendron P, Sahmi M, Lefrancois M, Baril C, et al. A functional screen reveals an extensive layer of transcriptional and splicing control underlying RAS/MAPK signaling in *Drosophila*. *PLoS biology*. 2014;12(3):e1001809.
492. Ashton-Beaucage D, Lemieux C, Udell CM, Sahmi M, Rochette S, Therrien M. The Deubiquitinase USP47 Stabilizes MAPK by Counteracting the Function of the N-end Rule ligase POE/UBR4 in *Drosophila*. *PLoS biology*. 2016;14(8):e1002539.
493. Liu W-H, Lai M-Z. Deltex Regulates T-Cell Activation by Targeted Degradation of Active MEKK1. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(4):1367-78.
494. Maruyama T, Araki T, Kawarazaki Y, Naguro I, Heynen S, Aza-Blanc P, et al. Roquin-2 promotes ubiquitin-mediated degradation of ASK1 to regulate stress responses. *Science signaling*. 2014;7(309):ra8.
495. Hwang JR, Zhang C, Patterson C. C-terminus of heat shock protein 70-interacting protein facilitates degradation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1-dependent apoptosis. *Cell stress & chaperones*. 2005;10(2):147-56.

496. Liu Y, Min W. Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circulation research*. 2002;90(12):1259-66.
497. Nagai H, Noguchi T, Homma K, Katagiri K, Takeda K, Matsuzawa A, et al. Ubiquitin-like sequence in ASK1 plays critical roles in the recognition and stabilization by USP9X and oxidative stress-induced cell death. *Molecular cell*. 2009;36(5):805-18.
498. He Y, Zhang W, Zhang R, Zhang H, Min W. SOCS1 Inhibits Tumor Necrosis Factor-induced Activation of ASK1-JNK Inflammatory Signaling by Mediating ASK1 Degradation. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(9):5559-66.
499. Zhao Y, Conze DB, Hanover JA, Ashwell JD. Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Signaling Induces Selective c-IAP1-dependent ASK1 Ubiquitination and Terminates Mitogen-activated Protein Kinase Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(11):7777-82.
500. Chen J, Miller EM, Gallo KA. MLK3 is critical for breast cancer cell migration and promotes a malignant phenotype in mammary epithelial cells. *Oncogene*. 2010;29(31):4399-411.
501. Zhan Y, Abi Saab WF, Modi N, Stewart AM, Liu J, Chadee DN. Mixed lineage kinase 3 is required for matrix metalloproteinase expression and invasion in ovarian cancer cells. *Experimental cell research*. 2012;318(14):1641-8.
502. Zhang H, Wu W, Du Y, Santos SJ, Conrad SE, Watson JT, et al. Hsp90/p50cdc37 is required for mixed-lineage kinase (MLK) 3 signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(19):19457-63.
503. Haupt A, Joberty G, Bantscheff M, Frohlich H, Stehr H, Schweiger MR, et al. Hsp90 inhibition differentially destabilises MAP kinase and TGF-beta signalling components in cancer cells revealed by kinase-targeted chemoproteomics. *BMC cancer*. 2012;12:38.
504. Blessing NA, Brockman AL, Chadee DN. The E3 ligase CHIP mediates ubiquitination and degradation of mixed-lineage kinase 3. *Molecular and cellular biology*. 2014;34(16):3132-43.
505. Korchnak AC, Zhan Y, Aguilar MT, Chadee DN. Cytokine-induced activation of mixed lineage kinase 3 requires TRAF2 and TRAF6. *Cell Signal*. 2009;21(11):1620-5.
506. Nakata K, Abrams B, Grill B, Goncharov A, Huang X, Chisholm AD, et al. Regulation of a DLK-1 and p38 MAP Kinase Pathway by the Ubiquitin Ligase RPM-1 Is Required for Presynaptic Development. *Cell*. 2005;120(3):407-20.
507. van der Vaart A, Rademakers S, Jansen G. DLK-1/p38 MAP Kinase Signaling Controls Cilium Length by Regulating RAB-5 Mediated Endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*. 2015;11(12):e1005733.
508. Baker ST, Opperman KJ, Tulgren ED, Turgeon SM, Bienvenut W, Grill B. RPM-1 Uses Both Ubiquitin Ligase and Phosphatase-Based Mechanisms to Regulate DLK-1 during Neuronal Development. *PLoS genetics*. 2014;10(5):e1004297.
509. Sharma J, Baker ST, Turgeon SM, Gurney AM, Opperman KJ, Grill B. Identification of a peptide inhibitor of the RPM-1 . FSN-1 ubiquitin ligase complex. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(50):34654-66.
510. Yu T, Tao Y, Yang M, Chen P, Gao X, Zhang Y, et al. Profiling human protein degradome delineates cellular responses to proteasomal inhibition and reveals a feedback mechanism in regulating proteasome homeostasis. *Cell Research*. 2014;24(10):1214-30.
511. Liu J, Han L, Li B, Yang J, Huen MS, Pan X, et al. F-box only protein 31 (FBXO31) negatively regulates p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling by mediating



lysine 48-linked ubiquitination and degradation of mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6). *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(31):21508-18.

512. Qi X, Pohl NM, Loesch M, Hou S, Li R, Qin J-Z, et al. p38 $\alpha$  Antagonizes p38 $\gamma$  Activity through c-Jun-dependent Ubiquitin-proteasome Pathways in Regulating Ras Transformation and Stress Response. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(43):31398-408.

513. Kotlyarov A, Yannoni Y, Fritz S, Laass K, Telliez JB, Pitman D, et al. Distinct cellular functions of MK2. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(13):4827-35.

514. Yamashita M, Ying SX, Zhang GM, Li C, Cheng SY, Deng CX, et al. Ubiquitin ligase Smurf1 controls osteoblast activity and bone homeostasis by targeting MEKK2 for degradation. *Cell*. 2005;121(1):101-13.

515. Wang XS, Diener K, Tan TH, Yao Z. MAPKKK6, a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, that associates with MAPKKK5. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;253(1):33-7.

516. Takeda K, Shimozono R, Noguchi T, Umeda T, Morimoto Y, Naguro I, et al. Apoptosis Signal-regulating Kinase (ASK) 2 Functions as a Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase in a Heteromeric Complex with ASK1. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(10):7522-31.

517. Ahn YH, Kurie JM. MKK4/SEK1 is negatively regulated through a feedback loop involving the E3 ubiquitin ligase itch. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(43):29399-404.

518. Tatebe H, Shiozaki K. Identification of Cdc37 as a novel regulator of the stress-responsive mitogen-activated protein kinase. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(15):5132-42.

519. Wang X, Merritt AJ, Seyfried J, Guo C, Papadakis ES, Finegan KG, et al. Targeted Deletion of mek5 Causes Early Embryonic Death and Defects in the Extracellular Signal-Regulated Kinase 5/Myocyte Enhancer Factor 2 Cell Survival Pathway. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(1):336-45.

520. Truman AW, Millson SH, Nuttall JM, King V, Mollapour M, Prodromou C, et al. Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of the Hsp90 chaperone that complements loss of the Slt2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryotic cell*. 2006;5(11):1914-24.

521. Erazo T, Moreno A, Ruiz-Babot G, Rodriguez-Asiain A, Morrice NA, Espadamala J, et al. Canonical and kinase activity-independent mechanisms for extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) nuclear translocation require dissociation of Hsp90 from the ERK5-Cdc37 complex. *Molecular and cellular biology*. 2013;33(8):1671-86.

522. Arias-Gonzalez L, Moreno-Gimeno I, del Campo AR, Serrano-Oviedo L, Valero ML, Esparis-Ogando A, et al. ERK5/BMK1 is a novel target of the tumor suppressor VHL: implication in clear cell renal carcinoma. *Neoplasia (New York, NY)*. 2013;15(6):649-59.

523. Kuo W-L, Duke CJ, Abe MK, Kaplan EL, Gomes S, Rosner MR. ERK7 Expression and Kinase Activity Is Regulated by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(22):23073-81.

524. Klevernic IV, Martin NMB, Cohen P. Regulation of the activity and expression of ERK8 by DNA damage. *FEBS letters*. 2009;583(4):680-4.

525. Jakobi R, McCarthy CC, Koeppel MA, Stringer DK. Caspase-activated PAK-2 is regulated by subcellular targeting and proteasomal degradation. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(40):38675-85.
526. Weisz Hubsman M, Volinsky N, Manser E, Yablonski D, Aronheim A. Autophosphorylation-dependent degradation of Pak1, triggered by the Rho-family GTPase, Chp. *The Biochemical journal*. 2007;404(3):487-97.
527. Brocchieri L, Karlin S. Protein length in eukaryotic and prokaryotic proteomes. *Nucleic acids research*. 2005;33(10):3390-400.
528. Patrick R, Cao K-AL, Davis M, Kobe B, Bodén M. Mapping the stabilome: a novel computational method for classifying metabolic protein stability. *BMC Systems Biology*. 2012;6:60-.
529. Rodriguez J, Pilkington R, Garcia Munoz A, Nguyen LK, Rauch N, Kennedy S, et al. Substrate-Trapped Interactors of PHD3 and FIH Cluster in Distinct Signaling Pathways. *Cell reports*. 2016;14(11):2745-60.
530. Taj G, Agarwal P, Grant M, Kumar A. MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant signaling & behavior*. 2010;5(11):1370-8.
531. Mitula F, Tajdel M, Ciesla A, Kasprowicz-Maluski A, Kulik A, Babula-Skowronska D, et al. Arabidopsis ABA-Activated Kinase MAPKKK18 is Regulated by Protein Phosphatase 2C ABI1 and the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Plant & cell physiology*. 2015;56(12):2351-67.
532. Yewdell JW, Lacsina JR, Rechsteiner MC, Nicchitta CV. Out with the Old, In with the New? Comparing Methods for Measuring Protein Degradation. *Cell biology international*. 2011;35(5):457-62.
533. Zhang D, Zaugg K, Mak TW, Elledge SJ. A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response. *Cell*. 2006;126(3):529-42.
534. Faustrup H, Bekker-Jensen S, Bartek J, Lukas J, Mailand N. USP7 counteracts SCFbetaTrCP- but not APCDdh1-mediated proteolysis of Claspin. *The Journal of cell biology*. 2009;184(1):13-9.
535. Yuan J, Luo K, Deng M, Li Y, Yin P, Gao B, et al. HERC2-USP20 axis regulates DNA damage checkpoint through Claspin. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(21):13110-21.
536. Zhu M, Zhao H, Liao J, Xu X. HERC2/USP20 coordinates CHK1 activation by modulating CLASPIN stability. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(21):13074-81.
537. Martin Y, Cabrera E, Amoedo H, Hernandez-Perez S, Dominguez-Kelly R, Freire R. USP29 controls the stability of checkpoint adaptor Claspin by deubiquitination. *Oncogene*. 2015;34(8):1058-63.
538. Li Z, Wang D, Na X, Schoen SR, Messing EM, Wu G. Identification of a deubiquitinating enzyme subfamily as substrates of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;294(3):700-9.
539. Chan NC, den Besten W, Sweredoski MJ, Hess S, Deshaies RJ, Chan DC. Degradation of the deubiquitinating enzyme USP33 is mediated by p97 and the ubiquitin ligase HERC2. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(28):19789-98.
540. Li J, D'Angiolella V, Seeley ES, Kim S, Kobayashi T, Fu W, et al. USP33 regulates centrosome biogenesis via de-ubiquitylation of a centriolar protein, CP110. *Nature*. 2013;495(7440):10.1038/nature11941.

541. Zhang Y-H, Zhou C-J, Zhou Z-R, Song A-X, Hu H-Y. Domain Analysis Reveals That a Deubiquitinating Enzyme USP13 Performs Non-Activating Catalysis for Lys63-Linked Polyubiquitin. *PloS one*. 2011;6(12):e29362.
542. Zhao X, Fiske B, Kawakami A, Li J, Fisher DE. Regulation of MITF stability by the USP13 deubiquitinase. *Nature communications*. 2011;2:414.
543. Liu J, Xia H, Kim M, Xu L, Li Y, Zhang L, et al. Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell*. 2011;147(1):223-34.
544. Zhang J, Zhang P, Wei Y, Piao HL, Wang W, Maddika S, et al. Deubiquitylation and stabilization of PTEN by USP13. *Nature cell biology*. 2013;15(12):1486-94.
545. Lee J, Zhou P. DCAFs, the Missing Link of the CUL4-DDB1 Ubiquitin Ligase. *Molecular cell*. 2007;26(6):775-80.
546. Schwarz SE, Matuschewski K, Liakopoulos D, Scheffner M, Jentsch S. The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(2):560-4.
547. Sriramachandran AM, Dohmen RJ. SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014;1843(1):75-85.
548. Tatham MH, Geoffroy M-C, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray EG, et al. RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nature cell biology*. 2008;10(5):538-46.
549. Fuhs SR, Insel PA. Caveolin-3 undergoes SUMOylation by the SUMO E3 ligase PIASy: sumoylation affects G-protein-coupled receptor desensitization. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(17):14830-41.
550. Lamoliatte F, Caron D, Durette C, Mahrouche L, Maroui MA, Caron-Lizotte O, et al. Large-scale analysis of lysine SUMOylation by SUMO remnant immunoaffinity profiling. *Nature communications*. 2014;5:5409.
551. McManus FP, Altamirano CD, Thibault P. In vitro assay to determine SUMOylation sites on protein substrates. *Nature protocols*. 2016;11(2):387-97.
552. Sahin U, Jollivet F, Berthier C, de The H, Lallemand-Breitenbach V. Detection of Protein SUMOylation In Situ by Proximity Ligation Assays. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2016;1475:139-50.
553. Martinez-Noel G, Galligan JT, Sowa ME, Arndt V, Overton TM, Harper JW, et al. Identification and proteomic analysis of distinct UBE3A/E6AP protein complexes. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(15):3095-106.
554. Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, Roos P, Taya Y, Karnitz LM, et al. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res*. 1999;59(17):4375-82.
555. Ciechanover A, Ben-Saadon R. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends in cell biology*. 2004;14(3):103-6.
556. Linding R, Jensen LJ, Diella F, Bork P, Gibson TJ, Russell RB. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure (London, England : 1993)*. 2003;11(11):1453-9.
557. Kravtsova-Ivantsiv Y, Ciechanover A. Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *Journal of cell science*. 2012;125(3):539-48.
558. Kommaddi RP, Jean-Charles PY, Shenoy SK. Phosphorylation of the deubiquitinase USP20 by protein kinase A regulates post-endocytic trafficking of beta2 adrenergic receptors

- to autophagosomes during physiological stress. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(14):8888-903.
559. Singhmar P, Kumar A. Angelman Syndrome Protein UBE3A Interacts with Primary Microcephaly Protein ASPM, Localizes to Centrosomes and Regulates Chromosome Segregation. *PloS one*. 2011;6(5):e20397.
560. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annual review of pathology*. 2014;9:47-71.
561. Alarcon R, Koumenis C, Geyer RK, Maki CG, Giaccia AJ. Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation. *Cancer Res*. 1999;59(24):6046-51.
562. Cockman ME, Webb JD, Kramer HB, Kessler BM, Ratcliffe PJ. Proteomics-based identification of novel factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) substrates indicates widespread asparaginyl hydroxylation of ankyrin repeat domain-containing proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2009;8(3):535-46.
563. Barrett TD, Palomino HL, Brondstetter TI, Kanelakis KC, Wu X, Haug PV, et al. Pharmacological characterization of 1-(5-chloro-6-(trifluoromethoxy)-1H-benzimidazol-2-yl)-1H-pyrazole-4-carboxylic acid (JNJ-42041935), a potent and selective hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor. *Molecular pharmacology*. 2011;79(6):910-20.
564. Abbas T, Sivaprasad U, Terai K, Amador V, Pagano M, Dutta A. PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex. *Genes & development*. 2008;22(18):2496-506.
565. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387(6630):296-9.
566. Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(11):6439-45.
567. Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, et al. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell*. 2003;112(6):779-91.
568. Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, et al. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature*. 2004;429(6987):86-92.
569. Kitagawa K, Kotake Y, Kitagawa M. Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products. *Cancer science*. 2009;100(8):1374-81.
570. Marquis M, Boulet S, Mathien S, Rousseau J, Thébault P, Daudelin J-F, et al. The Non-Classical MAP Kinase ERK3 Controls T Cell Activation. *PloS one*. 2014;9(1):e86681.
571. Kostenko S, Johannessen M, Moens U. PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cellular Signalling*. 2009;21(5):712-8.
572. Yi C, Maksimoska J, Marmorstein R, Kissil JL. Development of small-molecule inhibitors of the group I p21-activated kinases, emerging therapeutic targets in cancer. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(5):683-9.
573. Mansour M, Haupt S, Chan AL, Godde N, Rizzitelli A, Loi S, et al. The E3-ligase E6AP Represses Breast Cancer Metastasis via Regulation of ECT2-Rho Signaling. *Cancer Res*. 2016;76(14):4236-48.
574. Schwertman P, Bekker-Jensen S, Mailand N. Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(6):379-94.

575. Malu S, Malshetty V, Francis D, Cortes P. Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. *Immunologic research*. 2012;54(1-3):233-46.
576. Galanty Y, Belotserkovskaya R, Coates J, Jackson SP. RNF4, a SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase, promotes DNA double-strand break repair. *Genes & development*. 2012;26(11):1179-95.
577. Willmore E, de Caux S, Sunter NJ, Tilby MJ, Jackson GH, Austin CA, et al. A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood*. 2004;103(12):4659-65.
578. Bennardo N, Cheng A, Huang N, Stark JM. Alternative-NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair. *PLoS genetics*. 2008;4(6):e1000110.
579. Cortes Ledesma F, El Khamisy SF, Zuma MC, Osborn K, Caldecott KW. A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature*. 2009;461(7264):674-8.
580. Gao R, Huang SY, Marchand C, Pommier Y. Biochemical characterization of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2/TTRAP): a Mg(2+)/Mn(2+)-dependent phosphodiesterase specific for the repair of topoisomerase cleavage complexes. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(36):30842-52.
581. Palmer E, Freeman T. Investigation Into the use of C- and N-terminal GFP Fusion Proteins for Subcellular Localization Studies Using Reverse Transfection Microarrays. *Comparative and Functional Genomics*. 2004;5(4):342-53.
582. Luo K, Deng M, Li Y, Wu C, Xu Z, Yuan J, et al. CDK-mediated RNF4 phosphorylation regulates homologous recombination in S-phase. *Nucleic acids research*. 2015;43(11):5465-75.
583. Irminger-Finger I, Jefford CE. Is there more to BARD1 than BRCA1? *Nat Rev Cancer*. 2006;6(5):382-91.
584. Postow L, Ghenoiu C, Woo EM, Krutchinsky AN, Chait BT, Funabiki H. Ku80 removal from DNA through double strand break-induced ubiquitylation. *Journal of Cell Biology*. 2008;182(3):467-79.
585. Traven A, Heierhorst J. SQ/TQ cluster domains: concentrated ATM/ATR kinase phosphorylation site regions in DNA-damage-response proteins. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2005;27(4):397-407.